

11

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**RELACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA Y TIPO DE
QUIASMAS EN PROFASE TARDÍA Y METAFASE I, EN
CÉLULAS DE TESTÍCULO DE RATÓN**

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el laboratorio de genética del departamento de morfología de la Escuela Nacional de Ciencia Biológicas del I.P.N. bajo la dirección de:

Dr Arturo Piña Calva
Asesor
Q.B.P. Gustavo Miranda Contreras

1977-01-10

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADESIMIENTOS

A dios

Por permitirme llegar hasta este momento

A mi mama

Todo mi amor y admiración, así como mi profundo agradecimiento por su apoyo incondicional y cariño.

A mi papa

Con todo mi cariño gracias por todo .

A mis hermanos

Rosalía, Agustín, Dolores, Salvador y Andrea

Por su ejemplo y apoyo

A mi sobrina

Por iluminar mi casa con su llegada

A mis amigos

Elizabeth, Erendira, Alejandra, Carmen, Sandra, Marlen, Martín, Efrain, Guillermo, Maribel, Natividad, Gerardo, Arturo, Alejandro, Yedid, Jesús, María del Jesus

Por su apoyo, comprensión, ayuda cuando la necesite

A el Dr Arturo Piña y al Prof Gustavo Miranda.

Con respeto y admiración

A mis compañeros de laboratorio de genética

Pilar, Isela, Alejandra, Lolita, Nora, Sergio, Tenoch y Osiris

Por su apoyo y amistad

Al bioterio de la facultad de química de la U.N.A.M. a cargo de la M en C Isabel Gracia y la M.V.Z. Lucia Macias por la donación de animales empleados en este trabajo.

INDICE

	Pag
I	
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
I.1 TESTICULO	3
I.2 MEIOSIS	7
I.3 QUIASMAS	16
I.3.1 ANTECEDENTES HISTORICOS	16
I.3.2 CARACTERISTICAS GEERALES	18
I.3.3 TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS	19
I.3.4 QUIASMAS Y ALTERACIONES GENETICAS	19
II. JUSTIFICACIÓN	21
III HIPOTESIS	22
IV OBJETIVOS	23
IV.1 GENERALES	23
IV.2 PARTICULAR	23
V. MATERIAL Y METODO	24
V.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO	24
V.1.2 REACTIVOS	24
V.1.3 MATERIAL DE VIDRIO Y EQUIPO	25
V.1.4 METODOS	26
V.1.4.1 EXPERIMENTO I	26
V.1.4.2 EXPERIMENTO II	27
VI RESULTADOS	29
VI.1 QUIASMAS EN DIPLOTENO	29

VI. 1.1 TIPO DE QUIASMAS	29
VI. 1.2 TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS EN DIPLOTENO TEMPRANO	31
VI. 1.3 TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS EN DIPLOTENO TARDIO	31
VI. 1.4 TOTAL DE QUIASMAS EN DIPLOTENO	31
VI. 2. QUIASMAS EN DIACINESIS METAFASE I	32
VI. 2. 1TIPO DE QUIASMAS	32
V.2.1 TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS EN DIACINESIS METAFASE	34
V.3 TABLAS Y GRAFICAS	35
V.3.1 TABLA 3	35
V.3.2 GRAFICA 1	36
V.3.3 GRAFICA 2	37
V.3.4 TABLA 4	38
V.3.5 GRAFICAS	39
V.3.6 GRAFICO 4	40
V.3.7 TABLA 5	41
V.3.8 GRAFICA 5	42
V.3.9 TABLA 6	43
V.3.10 GRAFICA 6	44
V.3.11 GRAFICO 7	45
V.3.12 FOTOS	46
VI DISCUSION	49
VII CONCLUSIONES	56
VIII BIBLIOGRAFIA	57

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
TA	Asociación terminal
SL	Brazos largos
SL'	Brazos cortos
C	Centroméro
C S	Complejo sinaptonémico
PRINS	Clasificación in situ
Ds	Diacinesis
Ds-Me	Diacinesis – metafase
D	Diploteno
DT	Diploteno tardío
Dt	Diploteno temprano
E.L.	Elementos laterales
E.C.	Elemento central
Fig	Figura
F.T	Filamento transverso
°C	Grados centígrados
FSH	Hormona foliculo estimulante
LH	Hormona luteinisante
Kg	Kilogramos
li	Limite de interferencia
li min	Limite de interferencia mínima
li max	Limite de interferencia maxima
M	Meiosis
MI	Meiosis I
MIi	Meiosis II
mg	Miligramos
ml	Mililitros
min	Minutos
Me	Metafase
NR	Nódulos de recombinación
NRT	Nódulos de recombinación tardíos
NRT	Nódulos de recombinación tempranos
PUA	Proteína unidora de androgenos
RAD 51	Proteína unidora de androgenos análoga a PUA
RAD 50	Proteína unidora de androgenos analoga a PUA
MLM	Proteína unidora de androgenos analoga a PUA
ATM	Proteína unidora de androgenos análoga a PUA
BRCA 1	Proteína supresora de tumor
BRCA2	Proteína supresora de tumor
SCP1	Proteína del C.S.
SCP2	Proteína del C.S.
SCP3	Proteína del C.S
Q	Quiasma
Xt	Quiasma terminal
Xc	Quiasma centromérico

Xi	Quiasma intermedio
ICH	Quiasma intermedio
ICH ITA	Quiasma intermedio con una asociación terminal
T	Quiasma telomérico
C	Quiasma centromérico
I	Quiasma intermedio
TI	Quiasma telomérico intermedio
TC	Quiasma centromérico
CI	Quiasma centromérico intermedio
TIC	Quiasma telomérico intermedio centromérico
T2IC	Quiasma telomérico intermedio centromérico
Tia	Quiasma telomérico intermedio
Tib	Quiasma telomérico intermedio
Ia	Quiasma intermedio
Ib	Quiasma intermedio
Xc	Quiasma central
Xi	Quiasma intersticial
Xt	Quiasma telomérico
r.p.m	Revoluciones por minuto

RESUMEN

En el testículo se lleva a cabo la espermatogénesis, durante este proceso ocurre la recombinación genética, reducción del número cromosómico, y la diferenciación celular hasta espermatozoides. Una estructura celular íntimamente ligada a la recombinación y segregación durante la primera división meiótica, es el complejo sinaptonémico (C.S.). Este inicia su formación durante el zigoteno, adquiere su máxima expresión en paquiteno y tiende a desaparecer a partir del diploteno.

El C.S. es de naturaleza proteica y está formado por los elementos laterales (E.L.), filamentos transversos (F.T.), y un elemento central (E.C.). Entre los elementos laterales se ha observado complejos enzimáticos, denominados nódulos de recombinación (N.R.), que participan en el intercambio genético entre los homólogos.

Una vez que concluye la recombinación en paquiteno, los cromosomas homólogos tienden a separarse, pero permanecen unidos en puntos conocidos como **quiasma (Q)**. Estos están presentes desde la etapa tardía de la profase hasta la metafase I, y contribuyen a que la segregación cromosómica se lleve a cabo de manera correcta. Sin embargo, no se conoce con exactitud la dinámica de los **quiasmas**. Por tal razón, este trabajo tiene por objeto establecer el tipo y frecuencia de **quiasmas** en diploteno diacinesis -metafase. Los resultados de este trabajo serán el punto de partida para evaluar el efecto de los agentes mutagénicos sobre la frecuencia y tipo de **Q** y la relación de éstos con las alteraciones cromosómicas numéricas.

RELACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA Y TIPO DE QUIASMAS EN LA PROFASE TARDÍA Y METAFASE I, EN CÉLULAS DE TESTÍCULO DE RATÓN

I. INTRODUCCIÓN

Una de las preocupaciones del hombre, es conocer las causas y los mecanismos que explican la presencia de alteraciones en su descendencia, que de alguna forma les impide adaptarse y sobrevivir. De manera general, estas alteraciones pueden ser morfológicas o fisiológicas, y en muchos casos, están asociadas a cambios estructurales y / o numéricos en el material genético. Estos cambios pueden darse en la gametogénesis.

Para explicar el origen de las aneuploidías, en células germinales masculinas es necesario conocer lo que ocurre durante la espermatogénesis y el particular el comportamiento de los cromosomas durante la primera división meiótica, desde que se aparean los homólogos hasta su separación. Fenómenos que están íntimamente relacionados con el complejo sinaptonémico (C.S.) y la formación de *quiasma* (Q).

I. 1 TESTÍCULO

En general, los testículos poseen dos funciones, la producción de gametos y la síntesis de hormonas, son órganos ovoides situados en el escroto, cubiertos por una cápsula fibrosa y gruesa conocida como túnica albugínea (Russell 1990). Fig 1

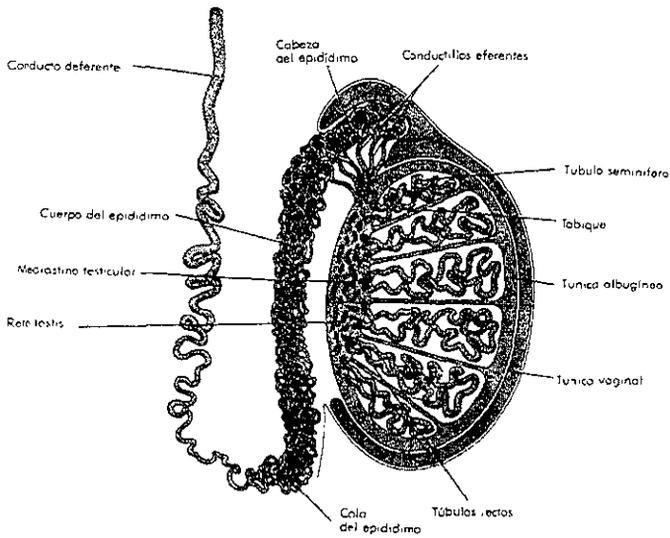


Fig 1. Representación esquemática de un testículo humano seccionado longitudinalmente (Ross/Romrell 1990)

Extendidos desde la parte interna de la cápsula, hay una serie de tabiques fibrosos que dividen el interior en varios lóbulos. Dentro de cada lóbulo, se encuentran enrollados los túbulos seminíferos. Desde el punto de vista histológico, el testículo está formado por túbulos seminíferos, y por tejido intersticial. Los primeros están constituidos por un epitelio germinal, el segundo por vasos sanguíneos, linfáticos y células de Leydig (Ross / Romrell 1989), Fig 2.

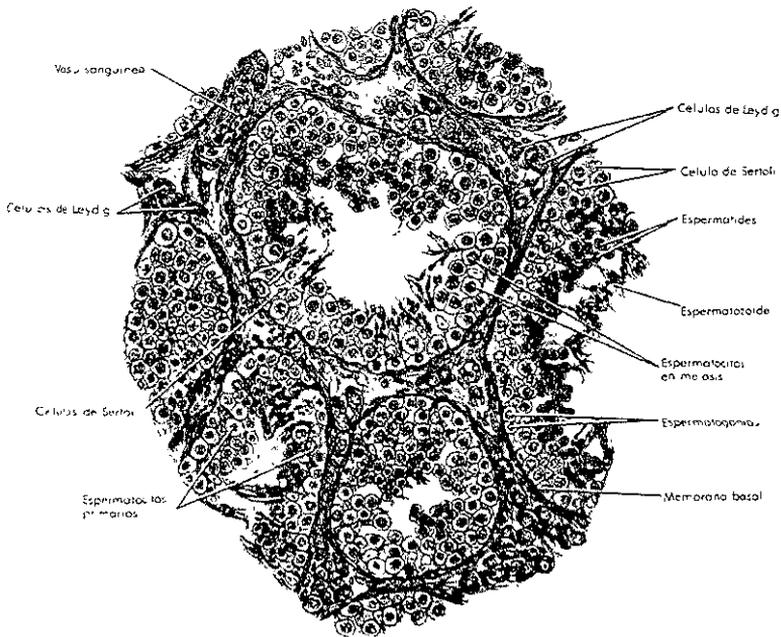


Fig 2 Corte transversal de un testículo humano (Ross/Romrell)

En los túbulos seminíferos existen dos compartimentos: el **basal** integrado por células de Sertoli y espermatogonias, y el **adluminal** donde se encuentran espermatoцитos y espermatozoides.

Compartimento basal:

En el compartimento basal se encuentran las células de Sertoli, éstas son una población no proliferante que forman complejos de unión entre sí y están en contacto con la lámina basal. Emiten prolongaciones que llegan a la luz de los túbulos y forman la llamada barrera hemato testicular que proporciona sostén físico a las células espermáticas. También participan en el movimiento de las células hacia la luz del túbulo, proporcionan nutrientes y además de fagocitar las células alteradas y las no viables (Russell, 1990).

Las células de Sertoli son estimuladas por la hormona folículo estimulante (FSH) para sintetizar proteínas; entre las que destacan la proteína unidora de andrógenos (PUA) y la inhibina. La primera se une a la testosterona, facilitando su entrada al núcleo de los espermatoцитos, la segunda regula en hipófisis la síntesis de la hormona luteinizante (LH) (Jones, 1987).

Las células germinales llamadas espermatogonias, constituyen una población formada por células en diversas fases de diferenciación. Las espermatogonias tipo A, que después varias divisiones mitóticas dan origen a las espermatogonias Intermedias y éstas a su vez, a las espermatogonias B (Russell 1990).

Compartimento adluminal:

El compartimento adluminal está formado por espermatoцитos primarios que ya iniciaron la división meiótica. A partir de este momento y en la medida que se llevan a cabo las divisiones meióticas y de diferenciación celular, se desplazan hacia la luz de los túbulos

Los espermatoцитos primarios recién formados por divisiones meióticas se convierten en espermatoцитos secundarios, que dan origen a células más pequeñas llamadas espermátides. Estas células haploides sufren una diferenciación morfológica llamada espermiogénesis que las convierte en espermatozoides después de una serie de cambios morfológicos. Es importante mencionar que en mamíferos existen patrones específicos de distribución de los distintos estadios de la espermatogénesis (Ross / Romrell 1989).

I. 2 MEIOSIS

La meiosis es un término que se utiliza para describir los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en el núcleo de las células germinales, dando como resultado células con un número haploide de cromosomas que se han recombinado. Para su estudio la meiosis totalmente se clasifica en primera y segunda división meiótica (MI y MII) (Zinkler 1998).

Desde fines del siglo XIX hasta nuestros días se han acumulado evidencias que demuestran lo anterior, por ejemplo Chapter demostró que el número cromosómico de *Saccharomyces cerevisiae* era la mitad en comparación con las células que le daban origen (citado por Moens 1987). A lo anterior se suman observaciones citológicas en células germinales, que evidencian relaciones entre los cromosomas homólogos que dan origen a estructuras en forma de cruz. A estos puntos de unión entre homólogos se les denomina Q (Moens 1987).

De manera paralela a los trabajos de citogenética, se realizaron estudios que confirmaban las leyes propuestas por Gregorio Mendel, sin embargo, algunos experimentos mostraban que el comportamiento de los genes no siempre seguían estas leyes, ya que al hacer algunas cruces de genotipos específicos, no siempre daban las frecuencias esperadas de fenotipos. La explicación que se dio a este fenómeno fue, que algunos genes están ligados y se segregan unidos. Lo anterior explicaba parte de los resultados obtenidos, pero no todos, por lo que se propuso una hipótesis complementaria. Esta consideraría que en algún momento de la meiosis, los cromosomas homólogos intercambian de manera recíproca genes, es decir, que había **recombinación genética** (crossing over). Esto da como resultado que la información genética presente en los cromosomas de origen paterno y materno de las células diploides, es diferente a la información presente en los cromosomas análogos de las células haploide. Después de la

meiosis, en los cromosomas hay información paterna y materna, porque hubo recombinación (Zinkler 1998; Tamann 1996).

En 1940 Barbara MacClintock, trabajando con diferentes variedades de maíz, logró situar varios genes en cromosomas específicos y al mismo tiempo encontró algunos marcadores morfológicos en estos cromosomas. Con estos elementos, después de realizar experimentos que implicaban la cruce de individuos con características genotípicas y fenotípicas bien definidas, demostró que: había recombinación genética entre homólogos, lo cual podría detectarse desde el punto de vista citogenético y fenotípico, ya que los cromosomas mostraban evidencias morfológicas del intercambio, confirmándose esto con la frecuencia de fenotípos resultante de la recombinación. Esta investigadora concluye que los puntos en donde se había dado intercambio entre homólogos correspondían al sitio en donde estaban los Q (Zinkler 1998)

La recombinación genética y el paso de un número diploide a un haploide son hechos que ocurren durante la meiosis, y que están plenamente demostrados, pero la explicación de los acontecimientos que tienen que darse para que éstos ocurran no se conoce con exactitud. En algunos casos, hay controversias sobre el significado y función de los eventos que ocurren durante la profase meiótica y en otras no se conoce las estructuras y organelos que intervienen durante las etapas. Por ejemplo, no se conoce bien la relación entre el ADN de los cromosomas meióticos y las proteínas que contribuyen a la compactación y adhesividad de las cromátidas hermanas; tampoco se sabe qué factores determinan el inicio del apareamiento de homólogos y la separación de éstos durante la metafase I sin que se separen los centromeros (Zinkler 1998)

PROFASE

Como ya se mencionó anteriormente, los acontecimientos que ocurren durante la meiosis sirven para dividirla formalmente en distintas etapas; a) meiosis I: profase I, metafase I, anafase I y telofase I, b) meiosis II: profase II, metafase II, anafase II y telofase II. Para los fines de este trabajo se describen a continuación

Las espermatogonias B que han replicado el material genético, éstas pasan por un período de reposo y en algún momento pasan la barrera hemato testicular para iniciar la meiosis. A partir de este momento, paulatinamente se empiezan a compactar los cromosomas, los cuales al **teñirse** con Giemsa se hacen visibles como hilos muy delgados, a esta etapa se le conoce como **leptoteno** (del griego leptos que significa delgado). A partir de este momento se inicia el reconocimiento entre homólogos. Algunos investigadores han mostrado que el ADN forma filamentos que se organizan en forma de asas, y que hay zonas en donde el material genético es más susceptible a sufrir dobles rupturas, a estas regiones se les conoce como puntos calientes (hotspot) (Bernard 1990; Moens, 1987). Se ha propuesto que estas dobles rupturas son el punto de partida para el reconocimiento, apareamiento y recombinación entre homólogos (Zinkler 1998; Bernard 1990) En estas zonas se han localizado enzimas y proteínas análogas en mitosis y están relacionadas con la reparación de ADN (Rad50, Rec A). En la medida que transcurre el tiempo, los cromosomas continúan compactándose, los telómeros tienden a unirse alrededor de la membrana nuclear y los homólogos se acercan

En la transición de leptoteno a **zigoteno** (zigo = apareamiento) los telómeros empiezan a desplazarse hacia una zona común de la envoltura nuclear. Al agrupamiento de telómeros y a las asas que forman los cromosomas se les denomina ramillete (buquet), esto marca el inicio del zigoteno, se piensa que este rearrreglo contribuye al apareamiento de homólogos (Sinapsis) (Zinkler 1989; Bernard, 1990).

En el zigoteno temprano, a lo largo de cada homólogo, de manera adyacente y discontinua empiezan a aparecer segmentos de filamentos protéicos que finalmente forman un eje conocido como eje axial (Moens 1987) Sobre estos ejes se encuentran los complejos protéicos de forma ovalada denominados nódulos de recombinación tempranos (NRT), en donde hay enzimas con capacidad para reparar rupturas de ADN (Carpenter 1975) Generalmente una vez que se empiezan a formar los ejes axiales, estos tienden a asociarse, con lo que se inicia la sinapsis y la formación del C S En la

medida que se forma el C.S. se pierde la organización del buquet, los pares de homólogos se mantienen unidos a la envoltura nuclear y tienden a distribuirse en la periferia del núcleo. (Zinkler 1989; Bernard 1990).

Se dice que la célula está en **paquiteno** (pakhus = grueso) cuando se ha completado la sinapsis total de los cromosomas homólogos, formados por dos cromátides hermanas (tétradas), también se observa que el C.S. está ya formado completamente (Bernard 1990).

El C.S. está constituido por dos elementos laterales (E.L.), (ejes axiales en zigoteno), situados a lo largo y de manera lateral en cada homólogo que ha sinaptado, estos elementos laterales corresponden a los ejes axiales que se observa durante zigoteno. La distancia que separa a los E.L. es de 120 nm y se conoce como espacio de apareamiento o central En este se encuentran unos filamentos llamados, filamentos transversos (F T), que aparentemente salen del E.L. (Moses 1990) Fig 3 a y b

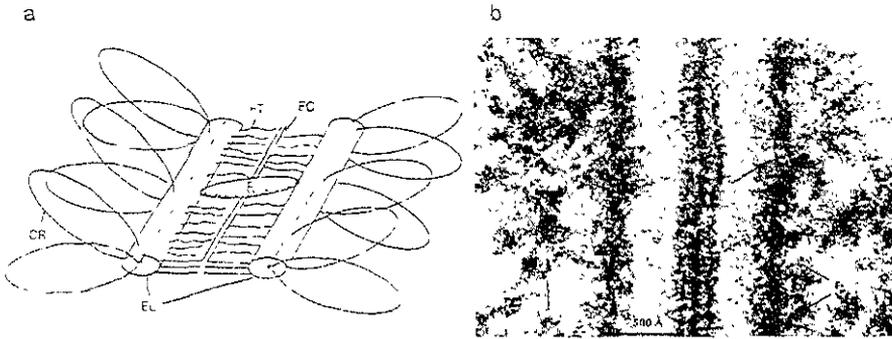


Fig 3 Estructura del complejo sinaptonémico a) fotografía al microscopio electrónico (Tamarrin 1996)
b) esquema tridimensional del C S en donde CR. es cromatina, E L. elemento lateral, E C elemento central,
F.T filamento transverso y R, nódulo de recombinación (Hoytin 1996)

Se ha propuesto que los F.T. se solapan en la parte central del espacio de apareamiento y den origen a el elemento central (E.C.) (Moses 1968, Heyting 1996). En general existe consenso en considerar que los E.L. son estructuras unitarias, sin embargo, hay observaciones que demuestran que cada E.L. está constituido por dos o tres filamentos (Moens 1969)

Con respecto a la composición química del C.S. se sabe que los filamentos se constituyen por una proteína denominada proteína de complejo sinaptonémico (SCP1), formada por 976 aminoácidos. El extremo N-terminal se encuentra localizado en la vecindad del E.C, mientras que el C-terminal esta sobre o dentro del E.L., se cree que tal vez forma dímeros, cuyo extremo N-terminal se une en el E.C. y mientras que el C-terminal se mantiene anclado en los E.L. La SCP1 muestra afinidad por el ADN en el extremo central, además, existe mucha similitud bioquímica entre las SCP1 de los diversos organismos (Heyting 1992).

Los E.L. se forman por dos proteínas la proteína del complejo sinaptonémico 2 (SCP2) y la proteína del complejo sinaptonémico 3 (SCP3), la primera se observa desde zigoteno hasta diploteno, es decir, durante y después de la sinapsis. Se piensa que podría facilitar el apareamiento de los homólogos (Heyting 1996). La segunda se detecta en los ejes cromosómicos, desde zigoteno hasta metafase I. En los cromosomas metafásicos se localizan en las regiones cercanas al centrómero, razón por la que se ha sugerido que podría ser un elemento que favorece la unión de las cromátidas durante esta etapa, cabe aclarar que no se ha detectado durante la profase meiótica (Dobson y colaboradores 1994) La SCP3 es susceptible de fosforilarse, lo que ocurre en mayor grado durante el paquiteno medio y temprano. Se especula si estos cambios, están relacionados con los cambios morfológicos que tiene el C.S., aun no se conoce el significado biológico de este fenómeno (Lawrie y colaboradores 1995).

Además de los componentes del C.S. específicos para la meiosis hay proteínas que no lo son y que también, se han observado asociadas con el C.S. Por ejemplo, la topoisomerasa II, es una enzima que se localiza en vecindad con el C.S., en particular durante las últimas etapas de la profase meiótica, se cree que es importante en la condensación de los cromosomas, la recombinación genética, segregación y tal vez en el paso de metafase a la anafase y de G2 a M. También se localiza en la estructura cromosómica, tanto en meiosis como en mitosis (Cobb y colaboradores, 1998)

Otros complejos proteico asociados al C.S., son los nódulos de recombinación tardíos (NRT) que se localizan en la parte central del C.S. Generalmente son esféricos y con un diámetro aproximado de 100 nm. En las zonas donde están situados, se ha detectado la presencia de ADN entre los E.L. y de proteínas relacionadas con la recombinación genética. RAD 51, MLH1, ATM, BRCA1, BRCA2 (Smith y Bernavente 1992). La RAD51, es homóloga a RecA de bacterias, durante la meiosis se relaciona con el reconocimiento de homólogos, recombinación y separación, a partir del paquiteno medio desaparece (Vazquez Nin 1993, Carpenter 1979)

La DMC1 y la MLH 1 están presentes en los NRT localizándose durante el zigoteno hasta el diploteno, coinciden con los puntos en donde aparecen los Q (Bernard 1990). La ATM se relaciona con la ataxia talangiectasia, enfermedad que se caracteriza por inestabilidad del gen, alta susceptibilidad de un individuo a contraer cáncer y alteraciones gonádicas, se ha propuesto que además participa en la recombinación, meiótica y regula el ciclo celular.

La BRCA1 y BRCA2 son proteínas supresoras de tumor que participan en la reparación de dobles rupturas de ADN tanto en mitosis como en meiosis, siempre se localizan en las zonas en donde aparecen RAD 51 (Schalk y colaboradores, 1998). En general se acepta que la recombinación genética concluye en paquiteno y que los NRT, son complejos multienzimáticos que canalizan las reacciones de intercambio recíproco (Vazquez Nin, 1993).

El **diplo**teno (diplo = doble) inicia con la separación parcial de los cromosomas homólogos y el desensamble del C.S, mientras que los cromosomas continúan engrosándose y acortándose, parecen repelerse unos a otros a lo largo de la mayor parte de su longitud (desinapsis), a pesar de esta separación los cromosomas continúan unidos a través de uno o más puntos conocidos como **Q**, estos puntos ayudan a mantenerlos unidos hasta la metafase I, y de esta manera aseguran una correcta segregación (Bernard 1990, Zinckler 1998).

En general los **Q** se definen como la expresión citológica de los eventos de recombinación genética, es decir, la expresión física del proceso mediante el cual los cromosomas intercambian segmentos homólogos de intercambio genético (recombinación); este proceso da como resultado cromosomas con nuevas combinaciones genéticas, siendo una fuente importante de variabilidad genética (Moens, 1987)

La **diacinesis** (dia- a través de) es la etapa de transición a la metafase I, en ella cesa la síntesis de ARN, los cromosomas siguen condensándose, engrosándose y se separan de la envoltura nuclear. Es difícil diferenciar o separar a esta etapa de la metafase I, sobre todo porque ambas tienen muy corta duración. En la **metafase I**, los centrómeros no se dividen y cada pareja de cromosomas homólogos se unen a las fibras del huso acromático, alineándose en un plano ecuatorial; esta separación constituye la base física de la segregación de los alelos

Anafase I: los cromosomas homólogos se separan y cada miembro de la pareja (diadas) se dirige hacia los polos opuestos, de esta manera cada cromosoma conserva un centrómero funcional. La última etapa meiótica es la **telofase I** en esta, las diadas alcanzan los polos del huso y se forma la membrana nuclear, en este momento culmina la primera división meiótica (reduccional), es decir, de $2n$ a n

En cuanto a la segunda división meiótica (MII), se dice que es semejante a una mitosis aún cuando se reduce a la mitad el material genético y no se reduce el número cromosómico por célula. En la **profase II** los cromosomas se observan largos y delgados en un número haploide, conforme avanza esta etapa los cromosomas se van condensando, la membrana nuclear desaparece y entran a la **metafase II** en donde los homólogos se orientan hacia el plano ecuatorial y se observa el huso acromático. Una vez que las células han llegado a este punto pasan a la **anafase II** en donde los centrómeros se separan y las cromátides son arrastradas por las fibras del huso. Al término de la anafase II se empiezan a separar las células y en la **telofase II**, ocurre la división de las dos células de la primera división meiótica de manera que ahora tendremos cuatro células con la mitad del material genético de la célula original Fig 4

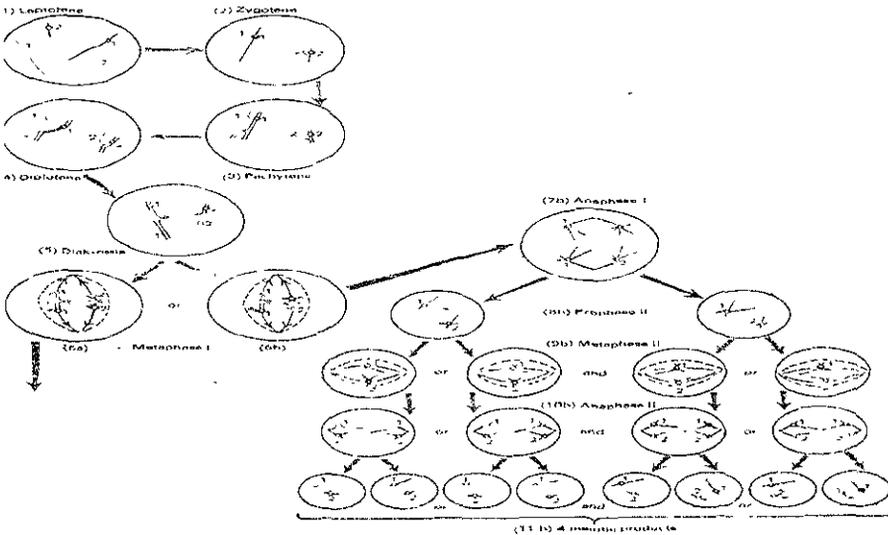


Fig 4. Diagrama de los cambios cromosómicos en la meiosis
El cromosoma oscuro pertenece al padre y el claro a la madre (West1973)

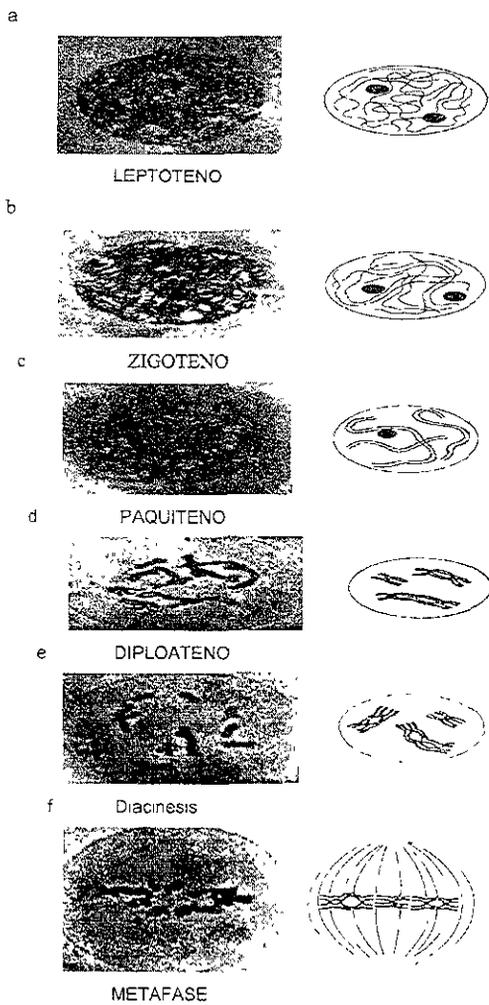


Fig5. Esquema de la profase I y metafase I de la meiosis
 a) leptoteno, b) zigoteno, c) paquiteno, d) diploteno, e) diacinesis, f) metafase (Tamarin 1996)

I. 3 QUIASMAS

I.3.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

Durante la profase meiótica ocurre el fenómeno de recombinación genética, que se manifiesta morfológicamente por los nódulos de recombinación y molecularmente por cambios en el ADN. Este fenómeno de recombinación recíproca se visualiza con el microscopio de luz, durante el diploteno y hasta metafase I, por medio de pequeños puntos de unión entre cromosomas, denominados **quiasmas**.

Los **quiasmas (Q)** fueron descritos por primera vez por Ruckert en 1892 en ovocitos de tiburón, sin embargo, no fue hasta 1909 que Janssen los describió completamente y les asignó el nombre. En sus estudios con anfibios Janssen notó que los bivalentes se presentan juntos en puntos o nodos a los que llamó **quiasma** y los definió en los siguientes términos, " la palabra **quiasma** (o **chiasmata**) debe tomarse en sentido general de dos extensiones, las cuales se cruzan una con otra en una cruz de San Andrés " Fig 6. A lo anterior se suman las observaciones de Darlington, en las cuales se refiere a la aparición de otra estructura similar a la cruz de San Andrés, pero abierta a la que denomina cruz griega, es decir, que la misma estructura puede asumir dos formas topológicas alternativas (Darlington 1932, citado por Jones 1987)

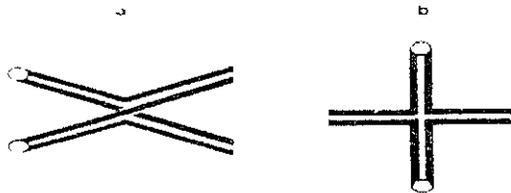


Fig 6 El quiasma de Janssen a) cruz de San Andrés, b) cruz griega (Jones 1987)

Basándose en lo antes mencionado, Darlington en 1937, propuso la hipótesis de "torsión de la formación del **quiasma**" que plantea que las cromátides exteriores eran las recombinantes y las de cruce eran las paternas. Dicha hipótesis es totalmente desmentida con la llegada de las técnicas moleculares modernas (BrdU/ FPG). Generalmente se asume que el **Q** es una figura tridimensional compleja y que ambas cruces se presentan dependiendo del plano en el que se observe (Jones 1987).

Posteriormente Janssen propuso que el **Q** es la manifestación citológica de los eventos de recombinación genética (teoría del **quiasma** tipo), sin embargo, hay otra teoría que se contrapone a la anterior y es la interpretación clásica de Wenrich y Robertson, que considera que el **Q** representa la convergencia de los diferentes modos de apertura o separación de las cromátides, por un lado entre cromátides homólogas y por otro entre las cromátides hermanas, por lo tanto no están relacionadas con el cruzamiento. La teoría del **quiasma** tipo fue generalizada en 1932 por Darlington, basándose en sus propias observaciones y en las de Belling, estableció que una cromátide de cada homólogo que forma el bivalente, esta asociada por ambos lados por un **Q** y que la recombinación genética entre homólogos, toma lugar entre dos cromátides diferentes antes de que se forme el **Q**.

En 1970, Solari trabajando con ratones machos, observó que durante la etapa inicial del diploteno, se encuentran regiones de convergencia entre cromátidas hermanas, en donde se hay residuos de C.S. a partir de estas observaciones dedujo que dichos puntos corresponden a los **Q**, (Solari 1998) con esta misma observación coinciden varios trabajos en diferentes variedades de maíz por Gillies, en hongos por Zickler, en *Ascaris* por Kundo y Bogdanov y en el hombre Holm y Rasmussen 1976. De esta manera Solari sugirió que el C.S. es un componente esencial e integral del **Q** y que de alguna manera es necesario para la transición de un evento de recombinación molecular a un **Q** citológico.

I.3.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES

La mayoría de los autores aceptan que los **Q** son puentes entre cromátidas hermanas, formados por residuos de C.S., que evidencian la existencia de un fenómeno previo de recombinación a nivel de ADN, este mecanismo es muy importante, pues permite que cada cromosoma de un individuo, pueda llevar genes de ambos progenitores, además, como ya se mencionó este fenómeno contribuye a la variabilidad genética de las poblaciones. Estas estructuras empiezan a aparecer durante el diploteno y continúan hasta metafase I, se requiere un mínimo de un **Q** por bivalente para sostener a los homólogos juntos y así asegurar una adecuada segregación cromosómica (Jones 1987).

Los bivalentes pueden tener un **Q** o más y toman diferentes formas en al microscopio, los bivalentes cortos con un **Q** único pueden adoptar formas distintas, por ejemplo, si el **Q** es intermedio tomará la forma de una cruz abierta en la cual todos los brazos son de tamaño similar, si el **Q** se encuentra cerca de un extremo, la forma que tomará será de una cruz en donde los brazos no tendrán el mismo tamaño. Cuando están presentes dos **Q** los bivalentes toman forma de un anillo e incluyen dos cruces abiertas, y los bivalentes con tres o más **Q** forman múltiples anillos (Bernard 1990) Fig 7

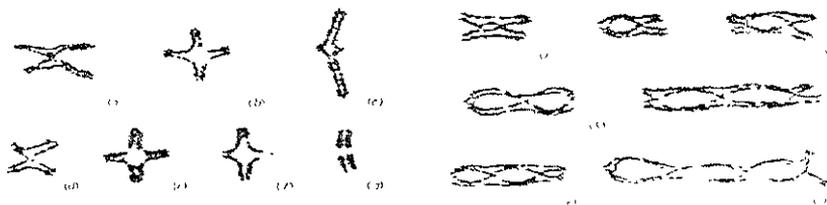


Fig 7 Representación de algunos tipos de **Q** a) intermedio, b) intermedio, c) telomérico, d) intermedio, e) intermedio, f) intermedio, g) telomérico, h) telomérico intermedio, i) telomérico intermedio, j) telomérico intermedio, k) telomérico intermedio centromérico, l) Intermedios, m) telomérico 2 intermedios centromérico, n) telomérico 3 intermedios centromérico (Bernard 1990)

I.3.3 TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS

Hay tres formas de localización principales, en la primera el **Q** esta localizado de manera proximal, de modo que se encuentra cercano al centrómero (Xc), de esta forma se encuentran la mayoría de los **Q** en muchas especies, en la segunda el **Q** se localiza de manera distal, aquí el **Q** esta alejado del centrómero (Xt), y la tercera es la intersticial (Xi), en la cual el **Q** se encuentra en el centro (Bernard 1990)

La distribución del **Q** en una célula depende parcialmente de la longitud de los cromosomas, es decir, que mientras más grandes sean tendrán más **Q**. El tipo y frecuencia de **Q**, es una característica particular de cada especie, por ejemplo en *Allium fistulosum* donde el 95% de todos los bivalentes tienen dos **Q** y el 98% de todos los **Q** están situados proximalmente, y de manera similar en *Trillium kamtschatum* el 87% de todos los bivalentes son biquiasmáticos y el 98% de todos los **Q**, están situados proximalmente, y en otras especies como el *acrididae sp* (saltamontes) y *hastella sp* muestran una combinación de distribución de **Q** proximal y distal dentro de la misma célula. (Mather 1937, citado por Bernard 1990)

I.3.4 QUIASMA Y ALTERACIONES GENÉTICAS

Durante la meiosis pueden ocurrir alteraciones de tipo numérico o estructural. Las alteraciones en el número cromosómico de las células puede originarse como el resultado del fenómeno denominado no disyunción o no separación cromosómica. Estas fallas pueden suceder tanto en la meiosis I, como en la meiosis II (antes, durante y después de la formación del **Q**)

De las alteraciones cromosómicas numéricas, las aneuploidías son por mucho las más comunes y clínicamente las más importante para el hombre, pues están presentes en un 10 a 30 % de todos los huevos fertilizados, y son la causa de casi 25% de todos los abortos. Además, en muchos casos las aneuploidías están asociadas a deficiencia mental (Bishop y colaboradores 1996).

Durante las últimas dos décadas, se han realizado esfuerzos para conocer en modelos animales, la relación entre alteraciones genéticas y recombinación por ejemplo en *Drosophila* y levaduras los mutantes que reducen la recombinación meiótica tienen frecuencias incrementadas de no disyunción. En humanos, hay evidencias de una asociación entre la recombinación aberrante y una trisoma ya que se han reportado niveles reducidos de recombinación del cromosoma 21 (Bishop y colaboradores 1996). Otras investigaciones sugieren que existen factores de riesgo entre los que destacan la edad materna y la exposición a algunos agentes químicos, físicos, biológicos o ambientales, con propiedades clastogénicas.

Por muchos años se han utilizado, una variedad de químicos inhibidores de la mitosis para la acumulación, de células en metafase I, incluyendo colchicina, colcemida y vblastina, las cuales actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina, dando como resultado la aneuploidía y poliploidía. El Benomyl (metil-1-[1-butil-1-carbomil]-2-benzimidazol-2-benzimidazol carbamato), inhibe la polimerización de la tubulina y da como resultado células aneuploides hijas (Jacobs y colaboradores, 1988). Otros ejemplos de productos que inducen alteraciones en la recombinación son algunos agentes mutagénicos, como el gas mostaza y el dietil sulfonato, ambos reducen el intercambio meiótico en *Chlamydomonas reinhardt* (Bishop y colaboradores 1996).

Existe evidencia limitada, principalmente en *Drosophila*, en que los excesos de ciertas sustancias normalmente encontrados en la dieta, por ejemplo calcio y selenio, pueden reducir los niveles normales de cruzamientos (Generoso 1996)

Considerando todo lo anterior, surge la necesidad de profundizar en el estudio de la relación entre el estudio de agentes mutagénicos, alteraciones cromosómicas en células germinales, los procesos de recombinación meiótica y dinámica de los **Q** durante la profase meiótica tardía

IV OBJETIVO

General :

IV. 1 Establecer el tipo y frecuencia de **Q** en espermatoцитos de ratón, durante el diploteno y diacinesis-metafase.

Particular.

IV. 2 Emplear métodos sencillos y baratos en estos estudios

V MATERIAL Y METODOS

V.1 MATERIAL BIOLÓGICO

20 ratones machos de la cepa NIH, de 3 meses de edad y con un peso aproximado de entre 25 y 30 grs.

V.1.2 REACTIVOS

Agua destilada
Acido acético glacial (Merck)
Acido clorhídrico (Merck)
Acido fórmico (Merck)
Azul de metileno (Sigma)
Cloruro de potasio (Merck)
Cloruro de sodio (Merck)
Colagenasa (Sigma)
Colchicina (Sigma)
Fosfato de potasio (Merck)
Fosfato de sodio (Merck)
Gelatina (Sigma)
Giemsa (Merck)
Hidróxido de bario (Merck)
Metanol (Merck)
Nitrato de plata (Merck)
Resina sintética (Sigma)
Kit de solución de sulfatos (Merck)
Xilol (Sigma)

V.1.3 MATERIAL DE VIDRIO Y EQUIPO

Balanza electrónica
Bebederos
Cajas de petri de vidrio
Centrífuga
Cubreobjetos
Estuche de disección
Estufa de incubación
Guantes desechables
Jaulas metálicas
Jeringas
Microscopio
Pipetas
Pipeta pasteur
Portaobjetos
Tubos de ensaye
Vasos de precipitados
Vasos de Copleen

V.1.4 MÉTODOS

Se realizaron dos experimentos por duplicado I (a y b) y II (a y b), empleando en cada caso, 5 ratones machos de la cepa NIH, de 3 meses de edad y con un peso entre 25 y 30 grs. El experimento I fue para determinar el tipo y frecuencia de **Q** en diploteno (temprano y tardío) y el II para establecer los parámetros anteriores en diacinesis-metafase.

V.I.5 EXPERIMENTO I (diploteno)

a) Obtención de células

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente se extrajeron los testículos y se les quitó la túnica albugínea. El tejido se colocó en 5 ml de una solución de colagenasa (8 mg en 5 ml) durante 30 min a 30 °C, resuspendiendo con una pipeta pasteur. Posteriormente se dejó sedimentar por gravedad el tejido no disperso y el sobrenadante se paso en un tubo de ensaye, esta operación se repitió dos veces más. A continuación se centrifugó durante 10 min a 1500 r.p.m., después se elimina el sobrenadante y las células se resuspenden nuevamente en 10 ml de cloruro de potasio (KCL), esta operación se repite 2 veces.

Después de la última centrifugación, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 10 ml de fijador (ácido acético-metanol, 1:3), a continuación se centrifugó 10 min a 1500 r.p.m. se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 3 ml de fijador.

Con la suspensión celular se hacen las preparaciones, dejando caer 3 gotas en un portaobjetos previamente lavado y desengrasado. Se dejan secar al aire.

b) Impregnación argéntica A las laminillas se les agregan dos gotas de nitrato de plata al 50 % y cuatro gotas de una solución de gelatina (100 ml de agua destilada, 2 gr de gelatina y 0.5 ml de ácido fórmico) Se coloca un cubre objetos y se deja actuar a los reactivos durante 2 minutos aproximadamente a una temperatura de 70 °C.

Posteriormente, se lavan con agua des ionizada. Se deshidratan con Xilol y se montan con resina sintética.

c) Análisis de las laminillas La revisión de laminillas se realizó a 100 X y se analizaron 30 células en dipioteno por cada ratón.

Los procedimientos para el experimento I.b son análogos a los del I.a.

V.1.6 Experimento II (DS-Me)

Tipo y frecuencia de quiasma durante diacinesis-metafase I.

a) Se inyectaron los ratones con colchicina (5 mg/Kg peso) 3 horas antes del sacrificio El procedimiento para la obtención de células y la elaboración de laminillas fue similar al descrito en el inciso a experimento I.a.

b) Para la obtención de bandas C, las laminillas se dejaron envejecer durante 1 semana, después se sometieron a la acción de ácido clorhídrico (HCl), 0.2N, en un vaso de Copleen se sumergen las laminillas envejecidas y se dejan por un lapso de 15 minutos, posteriormente se sacan, se lavan, con agua destilada y después de esto se sumergen en un vaso de Copleen con hidróxido de bario (Ba(OH)₂) preparado recientemente, después de 15 minutos se lavan y se dejan en otro vaso de Copleen con solución de sulfatos (SSC) a 64 °C por 60 min. Una vez pasado este tiempo se sacan, se lavan y se dejan secar al aire

c) Tinción. La tinción se realiza con Giemsa al 4% por 20 min.

d) El análisis citogenético se realizó en 30 células en metafase I

Los procedimientos para el experimento IIb son análogos a los del Ila.

La interpretación estadística de los resultados, se realizó utilizando la prueba de t de Student ($p= 0.05$)

VI RESULTADOS

VI.1 QUIASMAS EN DIPLOTENO (D)

Como ya se mencionó anteriormente, para determinar el tipo y frecuencia de **Q** en diploteno, se realizaron dos experimentos, I a y I b, empleando 5 ratones en cada caso.

En los dos ensayos, se analizaron las etapas tempranas y tardías del diploteno.

VI.1.1 Tipo de quiasmas

Conforme avanza la meiosis los cromosomas homólogos que están apareados totalmente (paquiteno), tienden a separarse, manteniéndose unidos por medio de **Q**. Cuando se emplean técnicas de impregnación argéntica durante el diploteno, se observan los elementos laterales que se han separado parcialmente y las zonas donde se llevó a cabo la recombinación genética, los **Q** (fotografía No 1) Estos pueden observarse en la región telomérica (T), centromérica (C), e intermedia (I), pudiéndose encontrar de manera única o en combinación de 2 o más tipos: telomérico centromérico, (TC), telomérico intermedio (TI), centromérico intermedio (CI), telomérico intermedio centromérico (TIC), telomérico 2 intermedio centromérico (T2IC) La tabla No 1 muestran los tipos de **Q** en diploteno.



Fotografía 1. Observada a 100 X de una célula en diploteno, las flechas muestran algunos **Q**.

Los tipos de Q fueron similares en las etapas temprana y tardía

TABLA 1. TIPO DE Q EN DIPLOTENO EXP IA Y IB.

Tipos de Qiasmas	T	C	I	TC	TI	CI	TIC	T2IC

* T= telomérico

* C= centromérico

* I = intermedio

* TC= telomérico centromérico

* TI= telomérico intermedio

* CI= centromérico intermedio

* TIC= telomérico intermedio centromérico

* T2IC=telomérico 2 intermedio centromérico

* Observaciones realizadas a 100 X

V I.1.2 Tipo y frecuencia de Q en diploteno temprano (Dt).

Los tipos y frecuencias de Q en Dt, del experimento I a y I b, se muestran en la tabla No 3. Al comparar estadísticamente (t student) los resultados de los dos ensayos se encontró que no había diferencia significativa ($p = 0.05$) (salvo en el caso del tipo de T2IC) Por tal razón y con el objeto de análisis y discusión se decidió sumar los resultados de los dos ensayos.

En orden descendente los tipos de Q más frecuentes fueron: TC ($\bar{X} = 5.63 \pm 0.18$), enseguida el T ($X = 2.72 \pm 0.21$), seguidos por el C ($X = 2.23 \pm 0.10$); y los menos frecuentes fueron T2IC ($X=0.18 \pm 0.5$). Los resultados se observan en la gráfica No 1 y 2.

VI.1.3 Tipo y frecuencia de Q en diploteno tardío (DT)

En la tabla No 4 se muestran las frecuencias de DT (Experimento 1 a y 1 b). Cuando comparamos estadísticamente (t Student) los resultados de los dos experimentos no se encontró diferencia significativa ($p = 0.05$), salvo en el caso del tipo T2IC Por esta razón se decidió sumar los ensayos, dando como resultado que en DT los tipos de Q que predominaron fueron T ($X = 7.01 \pm 0.26$), TIC ($X = 0.267 \pm 0.13$), y TC ($X = 2.62 \pm 0.15$) y los menos que son los T2IC ($\bar{X} = 0.41 \pm 0.11$). Los resultados obtenidos se encuentran en la gráfica No 3 y 4.

VI.1.4 Total de Q en diploteno.

En la tabla 5 se muestran las frecuencias totales de Q en Dt y DT, donde destaca que el número de Q del tipo T es más frecuente en el DT ($X = 2.7 \pm 0.21$) que en el Dt ($X = 2.7 \pm 0.21$) y los TC se comportan de manera contraria, es decir que en el temprano ($\bar{X} = 5.63 \pm 0.18$) son más frecuentes que en el tardío ($\bar{X} = 2.62 \pm 0.15$). También se observaron que los C disminuyen en los tardíos con respecto a los tempranos. En el caso de los intermedios sucede lo contrario, es decir la frecuencia en tardíos es alta y en tempranos es baja. Los resultados se observan en la gráfica No 5

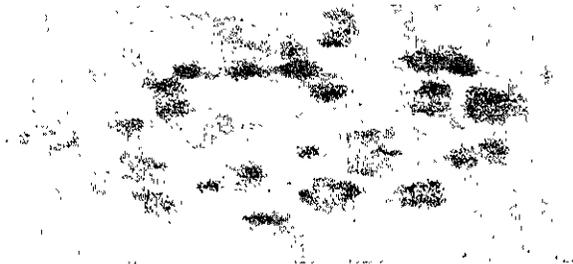
VI.2 Q EN DIACINESIS-METAFASE (DS - Me I)

Para determinar el tipo y frecuencia de **Q** en Ds-Me I, se realizaron dos experimentos, el II a y el II b, empleando 5 ratones en cada ensayo

VI.2.1 Tipo de Q

En la medida que avanza la profase meiótica, los cromosomas homólogos tienden a separarse y compactarse, pasando de una estructura larga y laxa (paquiteno diploteno) a otra de menor longitud y compacta (diacinesis - metafase I) donde los homólogos se mantienen unidos por **Q**.

Para determinar el tipo de **Q** durante la etapa de Ds-Me I se aplicaron técnicas para la obtención de bandas C y tinción con Giemsa (Fotografía 2). Se obtuvieron bivalentes unidos por un **Q** en la región telomérica (T) o intermedia (I). También se vieron pares de cromosomas unidos por estos dos tipos de **Q**, teloméricos y centromérico (TC) En el caso de los intermedios y los TC se pueden observar variaciones relacionadas con el grado de condensación cromosómica (I a, I b, T! a, Tb). La tabla No 2 muestra los diferentes tipos de **Q** en Ds - Me



Fotografía No 2 observación a 100 X de una célula en diacinesis-metase I, las flechas muestran algunos **Q**

Los tipos de Q que se encontraron fueron. T = telomérico, I = intermedio y algunas variaciones de estos, que se encuentran en la tabla 2.

TABLA 2. TIPOS DE Q EN DIACINESIS-METAFASE I EXP IIA Y IIB.

Tipos de Quiasmas	T	Ia	Ib	Tia	Tib

- * T= telomérico
- * Ia= intermedio tipo a
- * Ib= intermedio tipo b
- * Tia= telomérico intermedio tipo a
- * Tib= telomérico intermedio tipo b
- * Observaciones realizadas a 100 X

VI.2.2 Tipo y frecuencia de Q en Ds-Me I

En la tabla No 6 se muestran los resultados de los experimentos 2 a y 2 b. Al realizar el estudio estadístico (t Student $p= 0.05$) no se encontró diferencia significativa y por esta razón se decidió sumarlas. En esta tabla destaca que los tipo Q que predominan son los I a ($X = 6.5 \pm 0.17$), T ($X = 5.550 \pm 0.11$), y TI a ($X = 3.8 \pm 0.29$). Los que tienen menor frecuencia son TI b ($X = 0.6 \pm 0.09$) Los resultados obtenidos se encuentran en la gráfica No 6

TABLA 3 TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS EN DIPLOTENO TEMPRANO

Tipos de Medidas de frecuencia	T	C	I	chiasmas TC	TI	CI	TIC	T2IC
X1	2.8±0.40	2.24±0.17	0.7±0.19	5.74±0.31	1.16±0.18	2.08±0.27	2.2±0.20	0.08±0.02
X2	2.64±0.20	2.43±0.13	0.9±0.11	5.52±0.23	1.29±0.16	1.93±0.05	1.94±0.10	0.29±0.07
XI	2.7±0.21	2.33±0.10	0.8±0.11	5.63±0.18	1.22±0.11	2±0.13	2.09±0.12	0.18±0.05
Tt	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85
Tc	0.35	0.85	0.87	0.58	0.52	0.53	1.30	2.55

* T= Telomérico

* C= Centromérico

* I= Intermedio

* TC= Telomérico Centromérico

* TI= Telomérico Intermedio

* TCI= Centromérico Intermedio

* TIC= Telomérico Intermedio Centromérico

* T2IC= Telomérico 2 Intermedio Centromérico

* X1= Medias de experimento 1 a

* X2= Medias de el experimento 1 b

* XT= Medias totales

* Tt = t de student de tablas

* Tc = t de estudent calculada

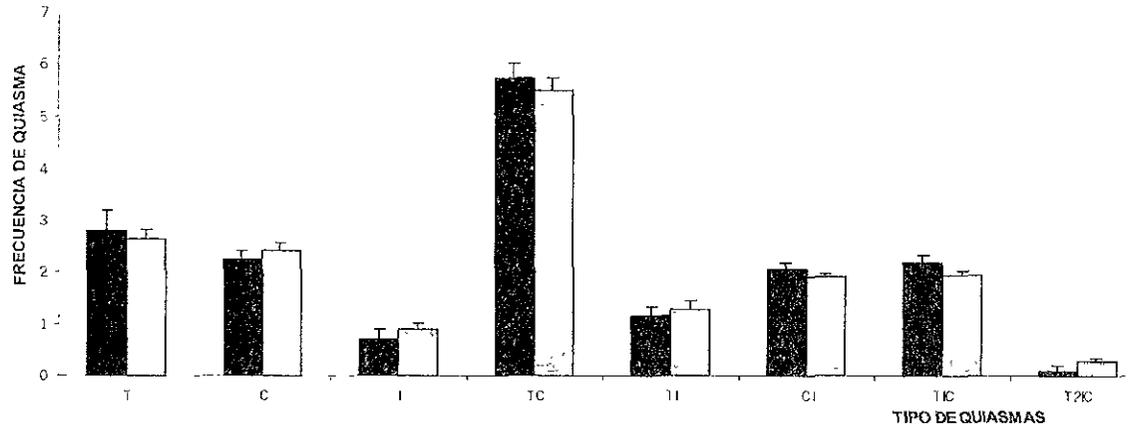


GRAFICO No 1 TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS EN DIPLOTENO TEMPRANO.

T = Telomérico, C = Centromérico, I = Intermedio, TC = Telomérico Centromérico, TI = Telomérico Intermedio, CI = Centromérico Intermedio, TIC = Telomérico Intermedio Centromérico, T2C = Telomérico 2 Intermedios Centromérico

■ Exp 1a □ Exp 1b

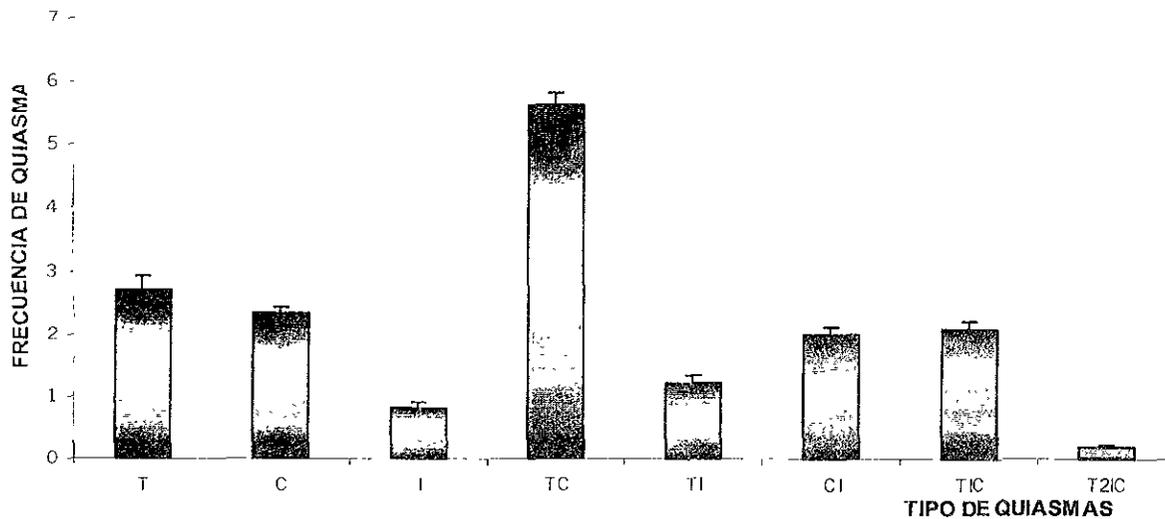


GRAFICO No 2 TIPO Y FRECUENCIA TOTAL DE QUIASMAS EN DIPOTENO TEMPRANO.

T = Telomérico, C = Centromérico, I = Intermedio, TC = Telomérico Centromérico, TI = Telomérico Intermedi, CI = Centromérico Intermedio, TIC = Telomérico Intermedio Centromérico, T2IC = Telomérico 2 Intermedios Centromérico



Exp 1 a

TABLA 4. TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS EN DIPLOTENO TARDIO

Tipos de chiasmas Medidas de frecuencia	T	C	I	TC	TI	CI	TIC	T2IC
X1	7.11±0.30	0.84±0.11	1.65±0.06	2.67±0.17	1.8±0.20	2.7±0.23	1.09±0.13	0.08±0.46
X2	2.8±0.40	1.22±0.20	1.5±0.07	2.58±0.26	1.47±0.12	2.6±0.15	0.98±0.03	0.75±0.035
XI	2.7±0.21	1.03±0.12	1.57±0.05	2.62±0.15	1.63±0.12	2.67±0.13	1.03±0.06	0.415±0.115
It	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85
Tc	0.35	1.58	1.64	0.28	1.39	0.54	0.80	1.49

* T= Telomérico

* C= Centromérico

* I= Intermedio

* TC= Telomérico Centromérico

* TI= Telomérico Intermedio

* CI= Centromérico Intermedio

* TIC= Telomérico Intermedio Centromérico

* T2IC= Telomérico 2 Intermedio Centromérico

* It= T de student de tablas

* Tc= T de student calculada

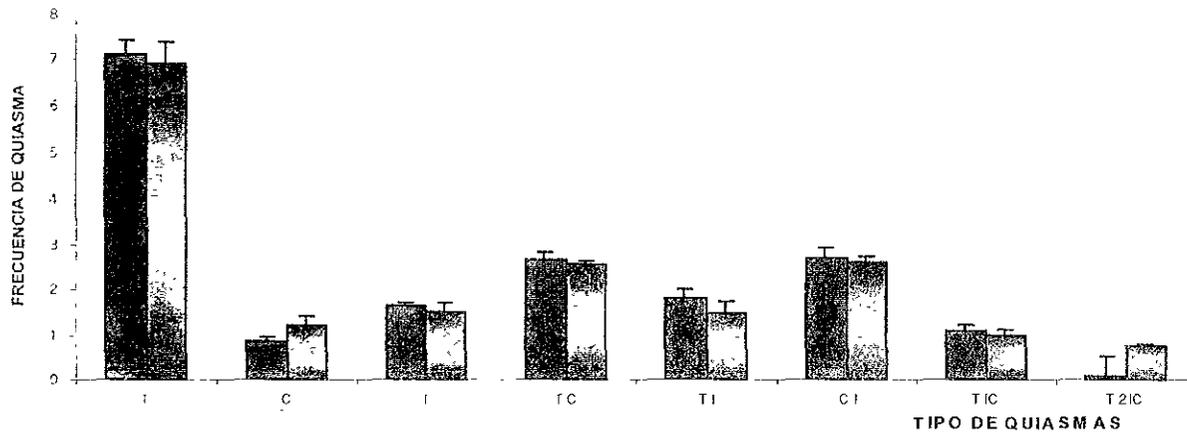


GRAFICO No 3 TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS EN DIPLOTENO TARDÍO

T = Telomérico, C = Centromérico, I = Intermedio, TC = Telomérico Centromérico, TI = Telomérico Intermedio, CI = Centromérico Intermedio, TIC = Telomérico Intermedio Centromérico, T2C = Telomérico 2 Intermedios Centromérico



Exp 1a



Exp 1b

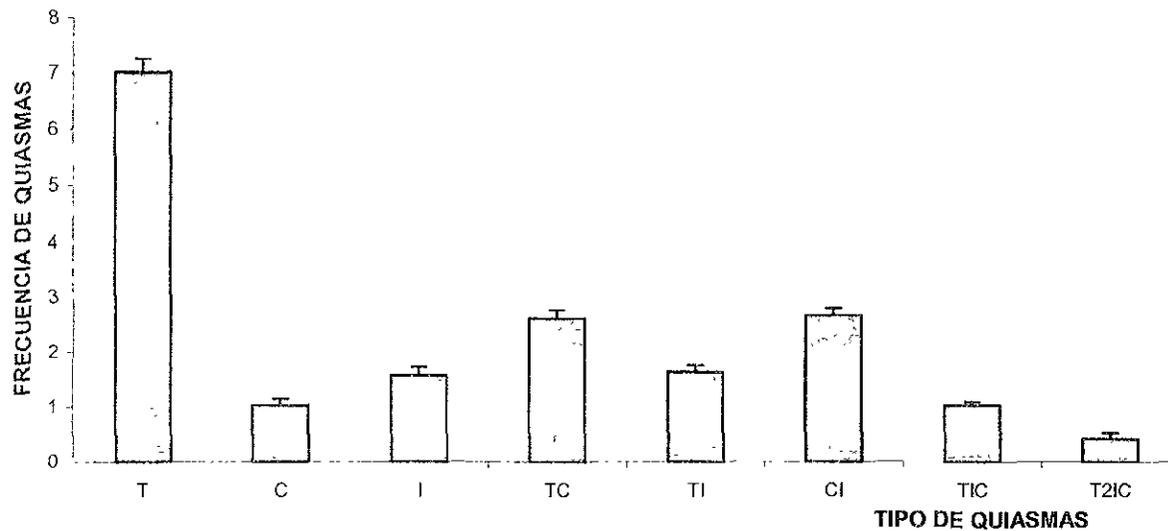


GRAFICO No 4 TIPO Y FRECUENCIA TOTAL DE QUIASMAS EN DIPLOTENO TARDIO

T = Telomérico, C = Centromérico, I = Intermedio, TC = Telomérico Centromérico, TI = Telomérico Intermedio, CI = Centromérico Intermedio, TIC = Telomérico Intermedio Centromérico, T2IC = Telomérico 2 Intermedios Centromérico

DT

TABLA 5. TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS EN DIPLOTENO

Tipos de quiasmas frecuencia de chiasmata	T	C	I	TC	TI	CI	TIC	T2IC
X1	2.72±0.21	2.33±0.10	0.8±0.11	5.63±0.18	1.22±0.11	2±0.13	2.09±0.12	0.18±0.05
X2	7.01±0.26	1.03±0.12	1.57±0.05	2.62±0.13	1.63±0.12	2.67±0.13	1.03±0.06	0.413±0.115

* T = Telomérico

* C = Centromérico

* I = Intermedio

* TC = Telomérico Centromérico

* TI = Telomérico Intermedio

* CI = Centromérico Intermedio

* TIC = Telomérico Intermedio Centromérico

* T2IC = Telomérico 2 Intermedio Centromérico

* X1 = Medias de diploteno temprano

* X2 = Medias de diploteno tardío

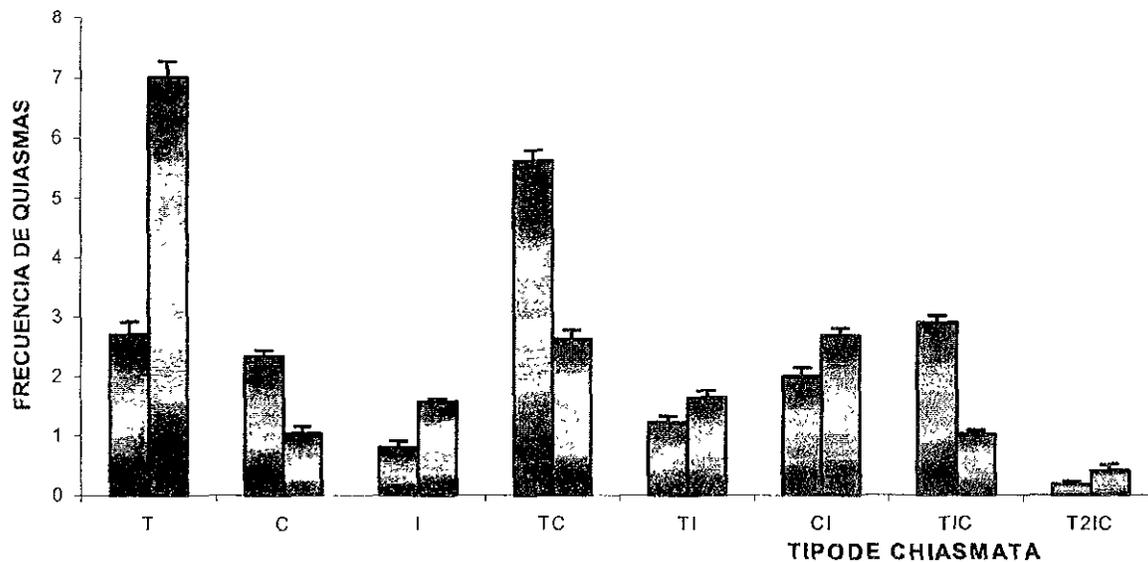


GRAFICO No 5 TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS EN DIPLOTENO TEMPRANO Y TARDIO

T = Telomérico, C = Centromérico, I = Intermedio, TC = Telomérico Centromérico, TI = Telomérico Intermedio, CI = Centromérico Intermedio, TIC = Telomérico Intermedio Centromérico, T2C = Telomérico 2 Intermedios Centromérico

 Diploteno temprano
  Diploteno tardío

TABLA 6 TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS EN DIACINESIS METAFASE .

Tipos de quiasmas Medidas de frecuencia	T	Ia	Ib	TIa	TIb
X1	5.5±0.22	6.22±0.26	0.8±0.22	3.9±0.31	0.68±0.13
X2	5.46±0.10	6.8±0.18	0.56±0.15	3.8±0.54	0.53±0.13
X _T	5.5±0.11	6.5±0.17	0.68±0.13	3.8±0.29	0.6±0.09
Tt	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85
Tc	0.56	1.6	0.20	1.17	0.67

* T= Telomérico

* Ia= Intermedio a

* Ib= Intermedio b

* TIa= Telomérico Intermedio a

* TIb= Telomérico Intermedio b

X1 = Medias de experimento 1a

X2 = Medias de experimento 1b

X_T = Medias totales

Tt = t de Estuden de tablas

Tc = t de Estuden calculada (p = 0.05)

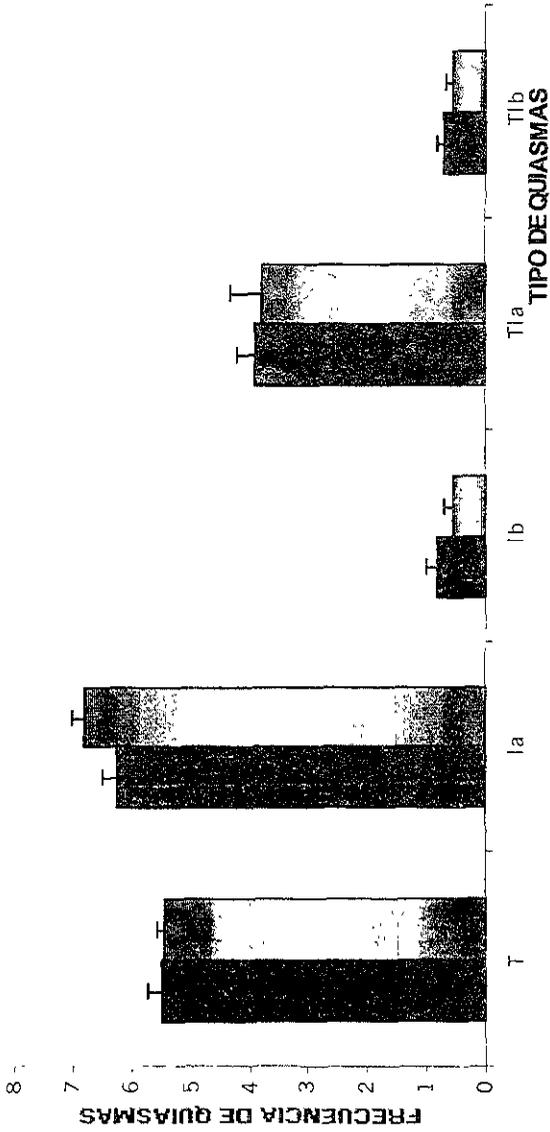


GRAFICO No 6 TIPO Y FRECUENCIA DE QUIASMAS EN DIACINESIS- METAFASE

T = Telómero, Ia = Intermedio tipo a, Ib = Intermedio tipo b, T1a = Telómero Intermedio tipo a, T1b = Telómero Intermedio tipo b

■ Exp 2 a
□ Exp 2 b

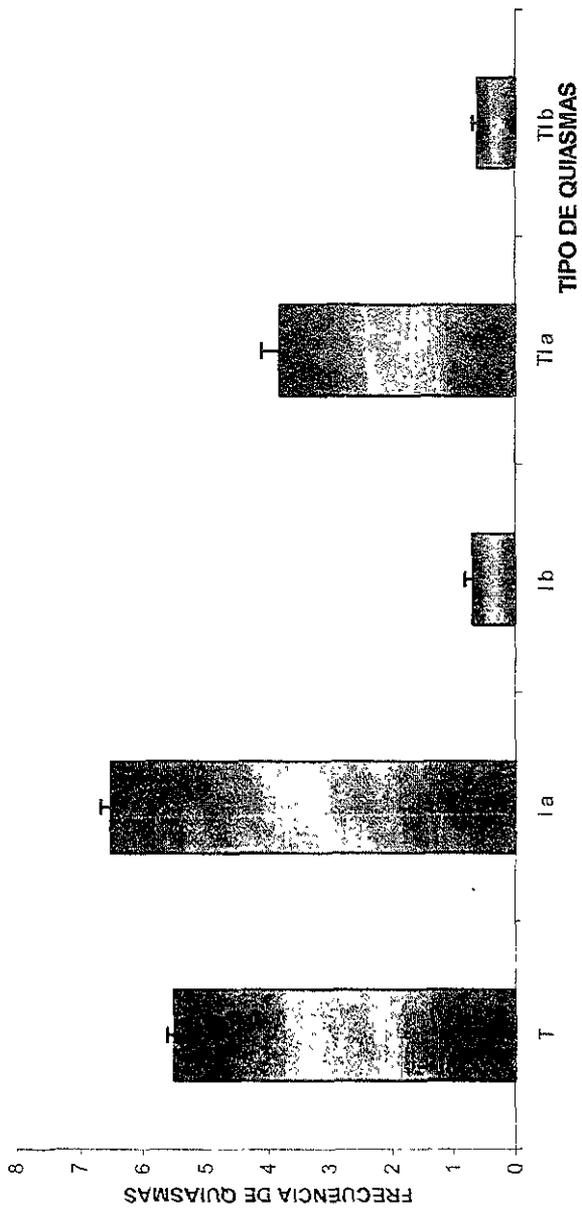


GRAFICO No 7 TIPO Y FRECUENCIA TOTALDE QUIASMAS EN DIACINESIS-METAFASE

T = Telomero, Ia = Intermedo o tipo a, Ib = Intermedo tipo b, TII a = Telomérico Intermedio tipo a, TII b = Telomérico Intermedio tipo b



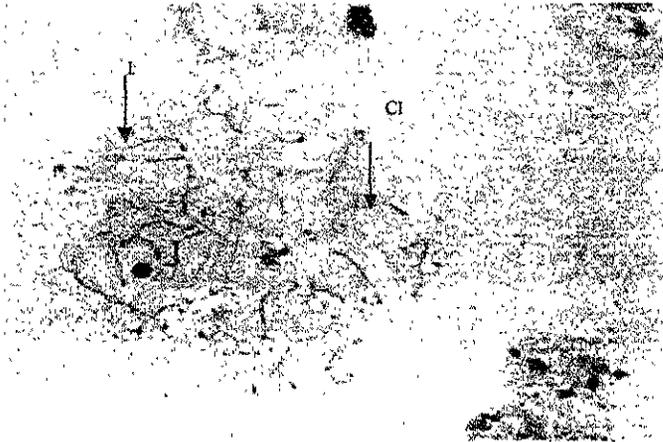
Fig. 2

DIPLOTENO TEMPRANO

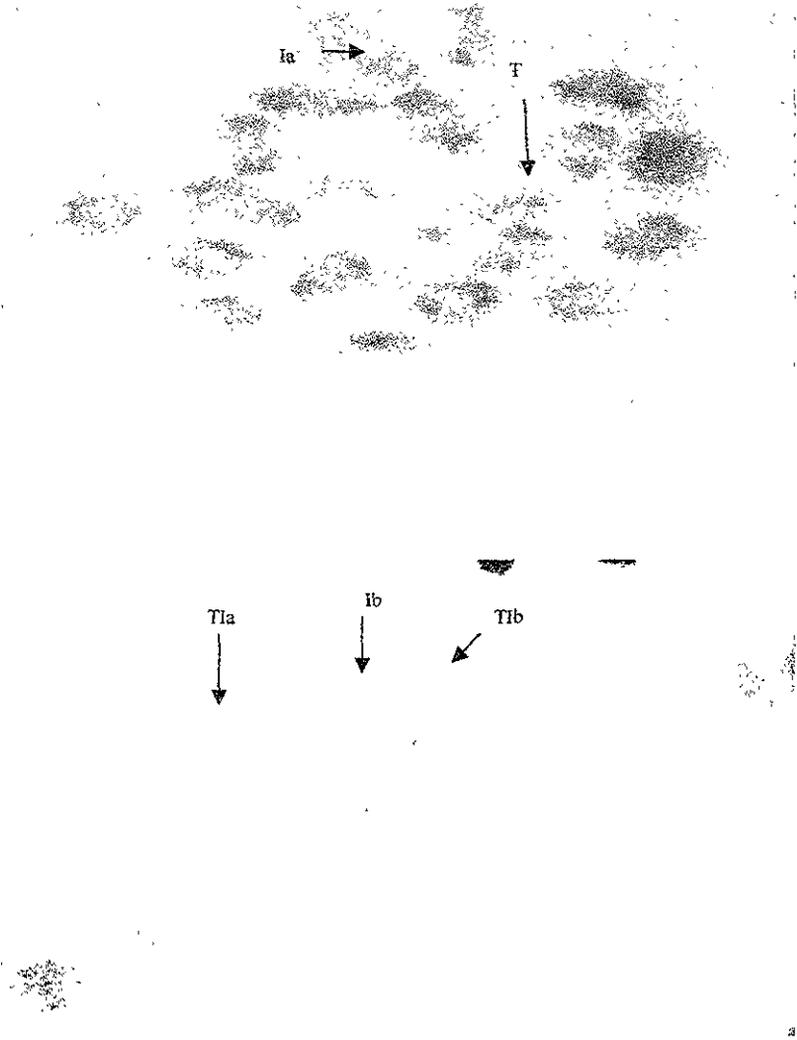
TC



T



METAFASE



DIPLOTENO TARDIO

← TIC



VII DISCUSIÓN

En el presente trabajo al caracterizar el tipo y frecuencia de **Q** que existen durante las etapas de D y Ds-Me I, encontramos que durante el periodo de D existen ocho tipos diferentes de **Q**, a los que nombramos de acuerdo a su localización en el bivalente: T, I, C, TI, TC, IC, TIC, T2IC. Estos sufren cambios en la frecuencia de D a Ds-Me I, solo tres tipos aparecen en Ds-Me I. T, I. y el TI, a los dos últimos los encontramos subdivididos en I a, I b, TI a y TI b, los otros tipos ya no aparecen durante esta etapa (tabla 2).

En la literatura los datos sobre tipos y frecuencia de **Q**, son muy escasos, solamente se encontraron cuatro trabajos en una revisión por medios electrónicos (www.ncbi.nlm.nih.gov), de 30 años atrás. En el primero los autores, utilizando el método de banda C, analizaron un total de 269 células, de las cuales 50 se encontraron en diploteno, 137 en diacinesis y 82 en metafase I, de lo que obtuvieron ocho tipos de **Q**, a los que denominaron de la manera siguiente 1CH, 2CH, 1TA, 2TA, 1CH-1TA, 1CH-2TA, 2CH-1TA, 2CH-2TA, estos tipos aparecieron durante las dos etapas de estudio (diacinesis y metafase I).

Al comparar los resultados que obtuvimos en este trabajo con los de Hirotsami y colaboradores encontramos que existen algunas concordancias y muchas diferencias. Algunas de éstas, se deben principalmente al método, pues nosotros utilizamos técnicas de impregnación argéntica para caracterizar las células en diploteno y para localizar la posición del centrómero en Ds-Me I utilizamos banda C. Los autores mencionados utilizaron únicamente técnicas de bandas C y solo caracterizaron las etapas de diacinesis y metafase I.

Analizando sus resultados encontramos que coincidimos en algunos tipos de **Q**, aun cuando son nombrados de manera distinta. Los **Q** análogos son: los T, que denominan asociación terminal (TA), los **Q** I, que llaman intersticiales (1CH) y los TI, a los que nombran intersticial con una asociación telomérica (1CH · 1TA). Los tipos de **Q** con los que no coincidimos, son los C, TC, CI, TIC y T2IC, coincidentemente en todos los casos se encuentra un **Q** de tipo C, este **Q** es el que se disocia, pues los cromosomas de ratón son teloméricos

Con respecto a las frecuencias, se observa que éstas son muy distintas, esto se debe a que se utilizaron cantidades diferentes de células, pues ellos utilizan 50 para diploteno (el artículo no dice la cantidad de ratones utilizados) y nosotros 20 por cada ratón, de un total de cinco ratones por experimento, esto hace que no sean comparables estadísticamente hablando

En el segundo artículo Hirotsami y colaboradores utilizan un método de tinción cromosómica convencional (Giemsa) y los centromeros se identificaron usando el método de impregnación argéntica modificado de Howell y Black. La obtención de información a nivel molecular sobre el tamaño de **Q** terminal se aplicó la técnica PRINS a los telómeros, dicha técnica ha sido desarrollada y establecida para localizar directamente las secuencias usando oligonucleótidos. Este trabajo, se realizó con testículos de *Mus plathythrix*, utilizando 600 cromosomas en total de donde se obtuvieron 50 células en diacinesis y se clasificaron los **Q** en tres categorías básicas, el **Q** centromérico (Xc), el **Q** intersticial (Xi), el **Q** terminal (Xt), estos **Q** fueron analizados en tres tipos de gráficas. La primera es la gráfica de distribución del **Q**, representada por dos parámetros, el tamaño de los brazos (SL) (ordenadas) y la distancia del Xi o Xt a partir del centrómero (abcisas); la segunda es la gráfica de la frecuencia del **Q**, la cual puede obtenerse a partir de la proyección de la ubicación del **Q** (Xc, Xi y Xt) en la gráfica de distribución de **Q**. para los brazos estandarizados (brazos cortos SL'), donde la distancia del SL' es 1.0 y la tercera

y última gráfica es la de interferencia de Q , la cual sirve para demostrar un patrón de distribución total de los valores de interferencia de Q intersticial (ii) a través de los cuales se puede estimar estadísticamente los valores de li_{max} (interferencia máxima) e li_{min} (interferencia mínima).

Al tratar de comparar nuestros resultados con los obtenidos por Hirotsami y colaboradores, nos dimos cuenta de que esto no se puede hacer ya que utilizaron diferentes especies y diferentes etapas de la profase. Es importante destacar que ellos utilizan la técnica de PRINS (Clasificación primaria in situ) para localizar regiones cromosómicas específicas, sin embargo, en este caso la técnica de banda C nos da resultados muy útiles, ya que con mucha facilidad se localizan las regiones centroméricas, además de ser muy económica, menos laboriosa y no requiere de equipos sofisticados

Dentro de la bibliografía encontrada, existe un tercer artículo, el de Anderson y colaboradores, donde describen una técnica de localización por inmunofluorescencia de la proteína MLH1, que forma parte de los NR. Utilizando rata macho ellos inmunolocalizan la MLH1 dentro de los cromosomas apareados, tiñendo con DAPI el DNA y utilizando anticuerpos SCP3 para hacer visibles los EL. En este artículo sólo obtuvieron las frecuencias de Q , y no se dividieron en tipos, no dice en que etapa trabajaron, pero a juzgar por las imágenes presentadas deducimos que se trabajó en paquiteno. Estos autores cuantifican el número de puntos en donde este presente la MLH1, que son los sitios en que ocurre el intercambio genético entre homólogos y este valor lo consideran como el número de Q . La cantidad de Q que ellos encuentran en paquiteno es superior a la que nosotros obtuvimos en este trabajo, esto concuerda con lo descrito en la bibliografía en donde se menciona que el número de nódulos de recombinación tiende a disminuir en la profase tardía y en consecuencia el número de Q (Bernard 1990)

En el cuarto trabajo los autores emplean espermatoцитos y ovocitos de ratón de la cepa 3H1, dichas células se encuentran en Ds-Me I, y utilizan la técnica banda C. En este experimento sólo se obtiene la frecuencia de **Q** y no el tipo, esta frecuencia es menor a la que obtuvimos nosotros. (Lawrie, Tease, Hultén, 1995). En el caso de los machos, estas diferencias podrían atribuirse a los métodos empleados para obtención de las células germinales (Baldev y Matthenw 1998). En las hembras, además de la diferencia en el método empleado, en la bibliografía hay trabajos que indican que el número de **Q** entre individuos de distinto sexo de una misma especie, pueden ser diferentes (Zickler 1998).

Con lo que respecta a las frecuencias que presentan los diferentes tipos de **Q**, encontramos que los de tipo T, aumentan de manera considerable de diploteno temprano (2.7 ± 0.21) a diploteno tardío (7.01 ± 0.26), de manera paralela los **Q** de tipo TC disminuyen de diploteno temprano (5.63 ± 0.18) a diploteno tardío (2.62 ± 0.15), al igual que los de tipo TIC (diploteno temprano 2.090 ± 0.12 a tardío 1.03 ± 0.06), esto nos hace suponer que el aumento en la frecuencia del tipo T, puede deberse a la disminución en la frecuencia de los tipos TC Y TIC, es decir que hay una pérdida o disociación de los **Q** de tipo C e I, en estos tipos. Podemos suponer que un bivalente que contenga un **Q** T y otro más, al perderse estos últimos da origen a un **Q** T. Algo análogo puede suceder en el caso de los intermedios, por ejemplo a el **Q** T le pueden dar origen los TI, TIC y el T2IC, a los I le podrían dar origen los IC, TIC, TI, y así sucesivamente). En diacinesis metafase I los **Q** de tipo T, disminuyen (5.5 ± 0.11) y los tipos TC, TIC desaparecen, esto sugiere que lo observado podría deberse a los mecanismos propios de la meiosis, por medio de los cuales conforme la meiosis avanza hacia el final de la profase los homólogos, tienden a agruparse hacia los polos opuestos, esto provoca disociaciones en algunos **Q**.

Es importante recordar que la meiosis no es un proceso sincrónico, de modo que no todos los cromosomas presentes en una célula deberán necesariamente avanzar de manera paralela en la meiosis, esto es que mientras algunos cromosomas en diploteno ya se encuentran separados, algunos otros están todavía, parcial o totalmente apareados, esto fue claro para nosotros por que en algunas células sí se llegó a observar.

También se observó el mismo fenómeno en los **Q** de tipo I, en los cuales aumenta la frecuencia en diploteno (temprano 0.8 ± 0.11 a tardío 1.57 ± 0.05), de la misma forma que en los **T**, esta evidencia sugiere que el aumento en la frecuencia de **Q** de tipo I, es la consecuencia de la pérdida de algunos tipos de **Q** quedando solo el intermedio de los **Q** de tipo TIC, CI y posiblemente en T2IC, aun cuando la frecuencia para estos dos últimos haya aumentado de diploteno temprano (2 ± 0.13) a diploteno tardío (2.67 ± 0.13), en el primer caso y de igual forma para el segundo (diploteno temprano 0.18 ± 0.5 a diploteno tardío 0.41 ± 0.11).

Si lo dicho en el **Q T** es cierto esperaríamos que este tipo de **Q** disminuyera ya que en diacinesis-metafase desaparecen, pero esto no fue así, probablemente por el tratamiento que reciben las células en la técnica ya que el aumento observado no es estadísticamente significativo. Otro tipo de **Q** del que se podría derivar el **Q** de tipo I es el TIC, el cual como ya se mencionó anteriormente disminuye en diploteno y desaparece en metafase. En el paso de diploteno a diacinesis-metafase el **Q** de tipo I se subdivide en dos: el I a (6.5 ± 0.17) y el I b (0.68 ± 0.13), estos subtipos pueden darse por que en diacinesis los cromosomas toman diferentes formas elípticas y lo que estamos viendo es el resultado de eso.

Las frecuencias observadas para los **Q** de tipo T1, aumentan de diploteno temprano (1.22 ± 0.11) a diploteno tardío (1.63 ± 0.12) y en metafase se subdividen en dos tipos, el T1a y el T1b (T1a 3.8 ± 0.29 y el T1b 0.6 ± 0.09), lo cual sugiere que el aumento en este tipo al igual que en los anteriores se debe a la disociación del **Q C** de los tipos TIC y T2IC, ya que estos desaparecen en diacinesis-metafase, esto de alguna manera corrobora lo antes mencionado.

Los **Q** de tipo C disminuyen su frecuencia en diploteno tardío (1.03 ± 0.12) en comparación con la observada en diploteno temprano (2.33 ± 0.10) y desaparece en diacinesis- metafase. La desaparición de los **Q C** podría explicarse por el hecho de que en la primera división meiótica los cromosomas no se separan en cromatides hermanas y para poder orientarse a cada polo es necesario que los **Q C** se eliminen, de esta forma se pueden orientar los microtúbulos y puedan segregar los cromosomas de manera adecuada.

En este trabajo se puede observar que a través de la profase tardía, el número de **Q** tiende a disminuir. El caracterizar la dinámica de los **Q** es el punto de partida para futuros estudios de mutagenicidad, ya que se ha observado que en organismos (levaduras, hongos y moscas) que presentan mutaciones en los genes que segregan la recombinación genética, se presentan problemas de no disyunción durante la primera división meiotica dando origen a aneuploidias o problemas de fertilidad. Considerando que hay numerosas sustancias asociadas a aneuploidias, es importante conocer si estas se originan a partir de alteraciones de apareamiento durante la meiosis.

Finalmente la frecuencia y tipo de **Q** pueden sufrir cambios, por la acción de diferentes agentes químicos, físicos o biológicos, sólo que no se conoce con exactitud de que manera los afectan, estos daños pueden provocar alteraciones en la fertilidad, mal formaciones, retraso mental o hasta la muerte de la descendencia. Es por esto que en los últimos años se han realizado esfuerzos para conocer más sobre este tema y sea encontrado por ejemplo, que de las diferentes clases de alteraciones cromosómicas, las aneuploidías son las más comunes y clínicamente las más importantes en el hombre, estas pueden ser provocadas por un grupo limitado de químicos como la ciclofosfamida y el etanol, agentes alquilantes como el acetaldehído y rayos X (Bishop 1996), que provocan disociaciones prematuras durante la metafase I y en consecuencia aneuploidías, que en individuos con problemas de fertilidad puede haber alteraciones en el apareamiento de homólogos, que puede ir desde apareamientos parciales hasta asinapsis y en consecuencia la recombinación genética se ve afectada y por ende los **Q**, el aumento de la probabilidad de daño en la descendencia con el aumento de la edad etc. Es por esto que estos resultados son el punto de partida para posteriores investigaciones, que nos permitan conocer el efecto genotóxico de los distintos agentes y los mecanismos de acción, para así evitar o disminuir la probabilidad de que la descendencia presente alteraciones genéticas.

VIII CONCLUSIONES.

De los resultados encontrados en este trabajo se puede concluir que.

- a) Los tipos y frecuencias de **Q** son específicos para cada etapa

- b) Que las frecuencias cambian de diploteno temprano a diploteno tardío y también a diacinesis-metafase I.

- c) Que desaparecen algunos tipos de **Q** para dar paso a otros en diacinesis-metafase I.

- d) Los resultados de este trabajo son el punto de partida para posteriores investigaciones que nos permitan conocer, de que manera afectan las diferentes sustancias a el tipo y frecuencia de **Q** y en que medida puede afectar esto a su descendencia

IX BIBLIOGRAFÍA

- 1 - Anderson K.L., Reeves A., Webb M.L., y Ashley T (1999) Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localización of MLH1 protein. *Genetics*. 151. 1569-1579
 - 2 - Baldev K.V y Matthew W (1998) Decondensation of pericentri heterochromatin alters the sequence of centromere separation in mouse cells. *Chromosoma*. 107:417-423.
 - 3.- Bailis M.J., y Roeder S.G.(1998). Synaptonemal complex morphogenesis and sister chromatid cohesion require Mek1-dependent phosphorylation of a meiotic chromosomal protein. *Genes Dev* 23: 3551-3563.
 - 4.- Batlev K.V., y Matthew W (1998). Decondensation of pericentric heterochromatin alters the sequence of centromere separation in mouse cells. *Chromosoma* 107: 417-423.
 - 5.- Bernard J (1990) Meiosis Events and mechanism of meiosis En: Meiosis Ed J Bernard Cambridge University Press, Gran Bretaña, pp 113- 191.
 - 6.- Bishop B J , Dellarco V L , Hassold T., Ferguson R L., Wyrobek J A. y Friedman J.M. (1996) Aneuploidy in germ cells Etiologies and risk factors. *Environ. Mol Mutagen* 28. 159-166.
 - 7 - Carpenter A.T.C. (1979) Synaptonemal complex and recombination nodules in wild type *Drosophila melanogaster* females. *Genetics* 511-541
 - 8- Chua R. P., y Shileen R.G (1997). Tam 1, a telomere- associated meiotic protein, functions in chromosome synapsis and crossing-over interference. *Genes Dev* 29 : 1786-1800
 - 9- Cobb J y Handell M.A. (1998) Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division *Sem. Cell Dev. Biol.* 9 445-450
 - 10.-Crolla J.A. y Polani P.E. (1989). Meiosis in trisomic female mice with Robertsonian translocations. *Cytogenet Cell Genet* 52 118-123.
-

-
- 11 - Delobel B, Djelati R., Robez G.O., Francoise C.M., Rousseaux-Prevost R., Rousseaux J, Rigot M.J, Rumpler Y. (1998) Y-autosome translocation and infertility: usefulness of molecular, cytogenetic and meiotic studies. *Hum. Genet.* 102: 98-102.
 - 12.- Dietrich A.J.J y Mulder R.J.P. (1981) A light microscopic study of the development and behaviour of the synaptonemal complex in spermatocytes of the mouse. *Chromosoma.* 83: 409-418.
 - 13.- Dietrich A.J.J. y DeBoer P. (1983) A sequential analysis of the development of the synaptonemal complex in spermatocytes of the mouse by electron microscopy using hydroxyurea and agar filtration. *Genetics.* 61: 119-129.
 - 14.- Dietrich A.J.J. y Mulder R.J.P (1983) A light and electron microscopic analysis of meiotic prophase in female mice. *Genetica.* 88: 377-385.
 - 15 - Dix J.D., Allenw J., Colins W.B., Poorman-Allen P., Mori Ch , Blizard D.R., Brawn R.P., Goulding H.E , Sthong D.B y Eddy E M (1997) HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Dev* 124: 4595-4603.
 - 16 - Dobson J M, Pearlman E.R., Kakis K.A., Spyropoulos B. y Moens B.P (1994) Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J.Cell Soc* 107 2749-2760.
 - 17 - Dolobel B ,Djelati R., Gabriel-Robez O , Rousseaux-Prevost., Rousseaux J., Rigot J-M., Rumpler Y (1998) Y-autosome translocation and infertility: usefulness of molecular, cytogenetic and meiotic studies. *Human Genet* 102: 98-102.
 - 18 - Eichenlaub-Ritter U (1996). Parental age-related aneuploidy in human germ cells and offspring: A story of past and present *Environ. Mol. Mutagen.* 28: 211-236.
 - 19.- Eijpe M, Heyting C., Gross B. y Jessberger R.K (2000) Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J. Cell Sci* 113: 673-682
 - 20.- Engebrecht J, Hirsch J, y Shirleen R.G. (1990) Meiotic gene conversion and crossing over: Their relationship to each other and to chromosome synapsis and segregation *Cell.* 62 927-937.
-

-
- 21.- Fang J.S y Jagiello G M. (1988) Analysis the chromosomere map and chiasmata characteristics of humans diplotene spermatocytes. *Cytogenet. Cell Genet.* 47: 52-57.
- 22.- Ferguson F. Lynnette, James W. Allen, James M.M. (1996) Meiotic recombination and germ cell aneuploidy. *Environ. Mol. Mutagen* 28. 159-166.
- 23 - Grell R.F, Oakberg E.F. y Generoso E.E. (1980) Synaptonemal complexes at premeiotic interphase in the mouse spermatocyte. *Genetics* 77: 6720-6723.
- 24.- Generoso W.M. (1996). The aneuploidy issue in germ cell mutagenesis. *Environ. Mol Mutagen.* 28 265-266.25 - Guitart M, Coll M.D., Ponsa M. y Egozcue J. (1985) Secuential study of synaptonemal complex in mouse spermatocytes by light and electromicroscopy *Genet* 67: 21-30.
- 25 - Hassold T. Abruzzo M , Adkins K., Griffin D., Merrill M., Millie E., Saker D., Shen J. Y Zaragoza M (1996) Human aneuploidy. incidence, origen and etiology. *Environ Mol. Mutagen* 28. 167-175.
- 26- Heemst V.D. y Heytin C. (2000) Sister chromatic cohesion and recombination in meiosis *Chromosoma* 109 10-26
- 27.-Heytin C. (1996). Synaptonemal complexes structure and function *Curr Op Cell Biol* 8 389-396
- 28.- Heytin C y Dietrich A.J.J. (1992) Synaptonemal complexes and the organization of chromatin during meiotic prophase *Cell Biol. Inter. Repor.* 16. 749-760.
- 29 - Hirota M T.I y Mriwaki K. (1982) A re-examination of chiasmata terminalization and chiasmata frecuency in male mice. *Chromosoma* 85: 439-452.
- 30.- Hirota M T.I., Masayasu Y.W., Hiroisa H , Yoichi M., y Kimiyuki T. (1999) Cytological, genetic and evolutionary functions of chiasmata based on chiasmata graph analysis. *J. theor Biol* 198: 239-257.
- 31.- Hofgartner F.J., Schmid M., y Krome W (1979) Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining *Chromosoma* 71. 197-216
- 32 - Howell W M y Black D.A. (1980) Controlled silver- staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer a 1-step method. *Experientia* 36 1014-1015
-

-
- 33.-Johannisson R. y Winking H. (1998) Pachytene chromosomes in trisomy 19 male mice with Robertsonian translocation. *Chromosoma Res* 6: 285-294
- 34.-Jones G.H (1987). Meiosis. Chiasmata. En: Meiosis. Ed. Academic Press Inc. pp.213-238.
- 35 - Lawrie N.M , Tease C , Hutten M.A. (1995) Chiasma frequency, distribution and interference maps of mouse autosome. *Chromosoma*. 140: 308-314.
- 36 - Lea M.L. y Grindley D.F.N. (1998) Architecture of the γ δ resolvase synaptosome: Oriented heterodimers identify interactions essential for synapsis and recombination. *Cell* 95: 553-562.
- 37 - Meywald T., Scherthan H y Nagl W (1995) Increased specificity of colloidal silver staining by means of chemical attenuation. *Hereditas* 124: 63-70.
- 38.- Moens P., Spyropoulos B. (1987) Meiosis. Introduction meiosis En Meiosis.Ed. De Academic Press inc pp 1-17.
- 39 - Moens P. Y Pearlman R. (1990) Telomera and centromere DNA are associated with the cores of meiotic prophase chromosomes. *Chromosoma* 100: 8-14.
- 40 - Moens P y Spyropoulos B. (1995) Immunocytology of chiasmata and chromosomal disjunction at mouse meiosis *Chromosoma*. 21 175-182
- 41 - Moses M J. (1968) Synaptonemal complex. *Ann Rev. Genet* 2: 363-412.
- 42.- Moses M.J., Poorman P A , Tepperben J.H.; Gibson J:P. Y Backer L C (1990) The synaptonemal complex as an indicator of induced chromosome damage En . *Biology of Mammalian Germ cell Mutagenesis*, cold spring harbor Laboratory press pp 113-54.
- 43.- Moens P , Pearlman R.E.y Heeng H Q.H. (1998) Chromosome cores and chromatin at meiotic prophase. *Curr Topics Devel Biol* 37: 241-263.
- 44.- Navarro J., Vidal F., Guitart M., y Egozcue J (1981) A method for the sequential study of synaptonemal complexes by light and electron microscopy. *Hum Genet*. 29 172-175.
- 45.- Odorisio T., Rodriguez T.A , Evans E P , Clarke A R y Rurgoynne P S (1998) The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis *Nature Genet* 18: 257-261.
-

-
- 46.- Pandita T, Westphal C H., Anger M., Sawahit S.G., Geard Ch.R., Pandita R K., y Scherthan H. (1999) Atm inactivation results in aberrant telomere clustering meiotic prophase Mol. Cell Biol. 19: 5096-5105.
- 47.- Pathak S Y Hsu T.C. (1979) Silver-stained structures in mammalian meiotic prophase Chromosoma. 70:195-203.49.- Pathak S. y Elder F F. (1980). Silver-stained accessory structures on human sex chromosomes. Hum. Genet. 54: 171-175.
- 48.- Piña C.A., Quezada M.R., Cassani G.M (1994) El complejo sinaptonémico estructura, función y daño genético. Acta Med. XXX: 31-40
- 49 - Preston J (1996) Aneuploidy in germ cell: Distribution of chromosome move components Environ. Mol Mutagen. 28 176-181.
- 50 - Ross H.M., Edward J R, Lynn J R (1989) Histología texto y atlas a color. Aparato genital masculino. En. Histología texto y atlas a color. Ed Panamericana pp 580-622
- 51 - Rufas J S , Giménez A., Suja J.A. y Garcia V.C (1987). Chromosome organization meiosis revealed by light microscope analysis of silver stained cores. Genome 29 706-712 54 - Russell E., Sinha H C (1990) Histological and histopathological evaluation of the testis. Mammalian spermatogenesis En Histological and histopathological evaluation of the testis. Ed. Cache River Press. Pp1-39.
- 52.- Russell L D (1990) Barriers to entry of substances into seminiferous tubules. compatibility of morphological and physiological evidence in banbury. Report 34. Biology of mammalian germ cell mutagenesis cold spring harbor laboratory pp 3-17.
- 53.- Sage J., Martin L., Meuwissen R., Heyting C., Cuzin F., Rassoulzadegan M (1999) Temporal and spatial control of the SyCp1 gene trascription in the mouse meiosis regulation elements active in the male are not sufficient for expression in the female gonad Mec.Dev 80: 29-39
- 54.- Schaik J.A C , Dietrich A.J.J , Vink A.C G., Offenbergh H H., Alderen M.V., Heyting C. (1998) Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synapatonemal complexes of the rat. Chromosoma. 107. 540-48
- 55.- Shen J.J , Sheman S L , Hassold T.J (1998) Centromeric genotyping and direct analysis of nondisjunction in humans: Down syndrome Chromosoma. 107 166-172
-

-
- 56.- Shirleen G.R (1990) Chromosome synapsis and genetic recombination their roles in meiotic chromosome segregation *Sev Sci Pub.* 6: 385-389.
- 57.- Solari J.A. (1998) Structural analysis of meiotic chromosomes and synaptonemal complexes in higher vertebrates. *Met.Cell Biol* 53:235-255.
- 58 - Smith A. y Benavente R. (1992) Identification of a structural protein component of rat synaptonemal complex. *Cell Res.* 198 277-291
- 59.- Sullivan A B , Stuart S. y Huntingta F.W (1996) Centromere of human chromosomes. *Environ Mol. Mutagen.* 28.182-191.
- 60.- Syben J. (1999) What makes homologous chromosomes find each other in meiosis? A review and hypothesis. *Chromosoma.* 108:209 219
- 61.- Switonski M., Danielak- czech B., Slota E. y Sysa P. (1998) Brief report lack of pairing loop formation in synaptonemal complex preparation of a boar carrying an inversion. *Hereditas* 128, 83-85.
- 62.- Tamarin H.R. (1996) Principios de genética. Mendelismo y teoría cromosómica En principios de genética.Ed.Reverte. Pp 15- 44.
- 63.- Tarsounas M., Pearlman R E , Gasser P.J , Park M.S. y Moens P.B. (1997) Protein-protein interactions in the synaptonemal complex. *Mol Biol.Cell.* 8: 1405-1414
- 64.- Tease Ch. (1998) Chiasmata distributions and chromosome segregation in male and female traslocation heterozygous mice analysed using FISH *Chromosome* 107: 549-558
- 65.- Tease Ch, Gareth H G. (1995) Do chiasmata disappear? An examination of whether closely spaced chiasmata are liable to reduction on loss. *Chromosome Res.* 53: 162-168.
- 66 - Therman E., Meeyor K.E. (1976) Cytological demostration of mitotic crossing- over in man. *Cytogenet Cell Genet.* 17 254-267.
- 67 - Vazquez Nin G.H., Flores E , Echeverría O.M , Merbert H y Wettstein R (1993) DNA in synaptonemal complex of rat and mouse spermatocytes and chick oocytes *chromosoma* 102: 457-463.
- 68.- Verma R., Babu A ,(1995) Human chromosomes principles and techniques Banding techniques En Human chromosomes and techniques De McGraw-Hill 2° Ed pp 78-80
-

-
- 69 -Villagómez D.A.T. (1993) Zygotene- pachytene substaging and sinaptonemal complex Karyotyping of boar spermatocytes. *Hereditas*. 118: 87-99.
- 70 - Walker Y.M., Hawley S.R. (2000) Hanging on to your homolog: the roles of pairing, synapsis and recombination in the maintenance of homolog adhesion. *Chromosoma* 109: 3-9
- 71 - Warburton D, Kinney A. (1996). Chromosomal differences in susceptibility to meiotic aneuploidy. *Environ. Mol Mutagen* 28: 237-247.
- 72 - West R.G, Day E.B., Ford E.B., Lewis B., John B., Spaine K.R.S., Jordan E.G., Spaine K.R (1973) Readings in genetics and evolution. Aselection of oxford biobgy readers. Pp 17.
- 73.- Wyrobek A.J.M Aardema, U. Eichen Laub-Ritter, L. Ferguson and F Marchetti (1996) Mechanisms and targets involved in maternal and paternal age effects on numerical aneuploidy *Env. Mol. Mutagen.* 28: 254-264.
- 74.- Yuan L, Pelttari J, Brundell E., Bojrkroth B., Zhao J., Liu J, Brismar H, Dranehotl B y Hoog C. (1998) The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo. *J Cell Biol* 142: 331-339
- 75 - Zickler D y Klecknar A.N. (1998) The leptotene- zygotene transition of meiosis *Annu Rev Genet.* 32 619-697.
- 76.- Zickler D y Kleckner A.N. (1999) Meiotic chromosome: Integrating structure and function. *Annu Rev Genet* 33: 603-705.
-